



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL
MESTRADO EM PARASITOLOGIA MÉDICA



**Estudo da Actividade Gametocitocida
de Derivados da Primaquina**

Élia Luísa Folgado Cabrita e Ramos



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



Estudo da Actividade Gametocitocida de Derivados da Primaquina

Élia Luísa Folgado Cabrita e Ramos

*Tese apresentada para a obtenção do grau de
Mestre em Parasitologia Médica*

Orientadora:

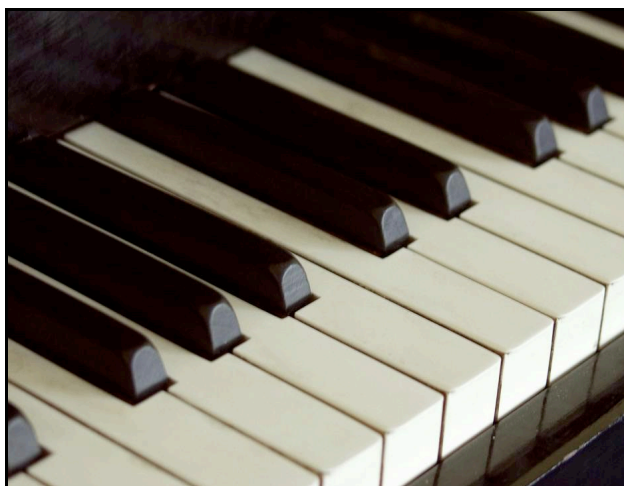
Doutora Fátima Nogueira

2011

Dedico esta nova conquista à minha FAMÍLIA e aos meus AMIGOS.

Em particular, à minha avó Luísa, à minha mãe, ao meu pai e ao meu marido.

Quero também dedicá-la aos meus amigos de quatro patas que muito foram negligenciados, com menos festinhas e colinho.



Há quatro mil milhões de anos,
a Terra era um jardim das delícias molecular.
Ainda não existiam predadores.
Algumas moléculas reproduziam-se a si mesmas,
não deixando atrás de si mais do que
cópias sem interesse de si próprias.
Com a reprodução, a mutação e a eliminação selectiva
das variedades menos eficientes,
a evolução já estava em andamento,
mesmo ao nível molecular...

Carl Sagan *in* Cosmos

Agradecimentos

Começo por fazer um especial agradecimento, como não poderia deixar de ser, à orientadora desta tese de mestrado, a Investigadora Doutora Fátima Nogueira. Ao longo destes meses, esteve sempre presente e participativa, e sem a qual a execução das técnicas poderia ter ficado comprometida, numa altura em que por motivos de falta de saúde seria muito complicado fazê-las sozinha. Foi um momento de elevada aprendizagem que fico a dever à Fátima. Fica aqui também a minha especial consideração pelo seu voto de confiança ao convidar-me para representar este grupo de trabalho no XIV Congresso Português de Parasitologia e por incluir o meu nome na lista de autores de publicações referentes a este trabalho.

Quero também agradecer à Professora Doutora Paula Gomes e à sua equipa pela amizade demonstrada e pelos ensinamentos que tiveram lugar entre a troca de emails. Foi com enorme prazer que participei neste projecto, no qual acredito vivamente.

Agradeço igualmente a todas as pessoas da unidade de malária e do CMDT pelo acolhimento e simpatia, assim como pelo auxílio sem reservas, sobretudo na manipulação dos animais, e à Professora Luzia Gonçalves pelo aconselhamento na área da estatística.

Por último, e já começo a sentir saudades, quero agradecer a TODOS os Professores do mestrado por serem pessoas tão especiais e únicas na forma como transmitem os seus preciosos conhecimentos, conseguindo levar os estudantes para outra esfera, a da sabedoria. E, claro, aos meus enormes AMIGOS e colegas do mestrado: António, Alexandre, Ana Teresa, Fabíola, Ana Rita e Eduardo. Um beijo enorme para vocês e muito obrigada!

Resumo

A malária é responsável pela morte de milhares de pessoas em todo o mundo. O bloqueio de transmissão do parasita ao vector, através da concepção de fármacos gametocitocidas, como é exemplo a primaquina, continua a ser uma das prioridades na luta contra a malária. Este trabalho apresenta os primeiros resultados sobre a actividade gametocitocida de novos derivados da primaquina – os primacenos – em murganhos infectados com *P. berghei* ANKA-GFP. Entre os seis compostos analisados, um deles bloqueou a transmissão em 100% dos casos estudados. A proteína verde fluorescente provou ser uma alternativa mais favorável na execução deste tipo de investigação, sobretudo na observação dos oocistos no intestino-médio dos mosquitos.

Palavras-chave: malária, primaquina, gametocitocida, primaceno, *P. berghei* ANKA-GFP.

Abstract

Malaria is a disease that causes thousands of deaths all over the world. The blockage of the transmission of the parasite to mosquito vector, through gametocytocides drugs, such as primaquine, is still a priority in the fight against malaria. This work presents new results on the gametocytocide activity of novel primaquine derivatives – the primacenes – on murines infected with *P. berghei* ANKA-GFP. Among the six compounds analyzed, one of them achieved a parasite transmission blockage ratio of 100% of the study cases. The green fluorescent protein proved to provide significant advantage when conducting a study of this kind, particularly for detecting oocysts in the medium intestine of mosquitoes.

Key-words: malaria, primaquine, gametocytocide, primacene, *P. berghei* ANKA-GFP.

Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	viii
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	ix
I. Introdução.....	1
I.1 Importância Médica e Epidemiológica da Malária.....	1
I.2 Ciclo de Vida do Parasita.....	2
I.3 Aspectos Relevantes do Vector.....	5
I.4 Tratamento da Malária: A Importância da Primaquina.....	6
II. Objectivos.....	13
III. Material e Métodos.....	14
III.1 Material Biológico.....	14
III.2 Descrição das Técnicas.....	15
III.3 Metodologia.....	17
III.4 Análise Estatística.....	19
IV. Resultados.....	20
IV.1 Implementação de um Novo Modelo Murino.....	20
IV.2 Avaliação da Actividade Gametocitocida de Primacenos.....	22
V. Discussão.....	30
VI. Conclusão.....	34
VII. Referências Bibliográficas.....	xi
VIII. Anexos.....	xxiii
VIII.1 Tratamento de Dados Referentes à Implementação de um Novo Modelo Murino – Parasitemia.....	xxiv
VIII.2 Tratamento de Dados Referentes à Implementação de um Novo Modelo Murino – Oocistos.....	xxviii
VIII.3 Tratamento de Dados Referentes à Avaliação da Actividade Gametocitocida de Primacenos – Oocistos.....	xxxii

Índice de Figuras

1 –	Distribuição mundial da malária.....	1
2 –	Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp</i>	2
3 –	Invasão de um eritrócito por um merozoíto.....	5
4 –	Esquema da cabeça de um macho e de uma fêmea anofelínea.....	6
5 –	Fórmulas moleculares e químicas de alguns antimaláricos.....	8
6 –	Estrutura molecular e fórmula química da tafenoquina e da bulaquina.....	11
7 –	Estruturas moleculares dos primacenos.....	12
8 –	Esquema da dissecação do mosquito para extracção do intestino-médio.....	17
9 –	Distribuição da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.....	20
10 –	Distribuição do número de oocistos em ANKA e em ANKA-GFP.....	22
11 –	Distribuição do número de oocistos no ensaio dos primacenos.....	23
12 –	Distribuição do número de oocistos em BIC-101, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.....	24
13 –	Distribuição do número de oocistos em BIC-221, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.....	25
14 –	Distribuição do número de oocistos em BIC-521, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.....	26
15 –	Distribuição do número de oocistos em BIC-226, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.....	27
16 –	Distribuição do número de oocistos em BIC-227, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.....	28
17 –	Distribuição do número de oocistos em BIC-902, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.....	29

Índice de Tabelas

1 –	Principais antimaláricos utilizados na prática clínica.....	7
2 –	Ensaio realizado no estudo do novo modelo murino.....	18
3 –	Ensaio realizado no estudo dos primacenos.....	20
4 –	Taxa de infecção e intensidade de infecção em ANKA e em ANKA-GFP.....	21
5 –	Taxa de infecção e intensidade de infecção no estudo dos primacenos.....	23
6 –	Actividade contra a fase eritrocitária em <i>P. falciparum</i> e contra a fase intra-hepática em <i>P. berghei</i> dos primacenos em estudo.....	33
7 –	Parasitemias determinadas durante os quatro dias pós-infecção e resultados da exflagelação.....	xxiv
8 –	Estatística descritiva dos resultados da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.....	xxv
9 –	Teste da normalidade para a parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.....	xxvi
10 –	Teste da homogeneidade das variâncias da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.....	xxvi
11 –	Sumário do teste de hipóteses para amostras independentes Kruskal-Wallis na análise da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.....	xxvii
12 –	Número de oocistos por intestino-médio de mosquito em ANKA e em ANKA-GFP.....	xxviii
13 –	Estatística descritiva dos resultados dos oocistos em ANKA e em ANKA-GFP.....	xxx
14 –	Teste da normalidade para os oocistos de ANKA e ANKA-GFP, subgrupo sem tratamento.....	xxxi
15 –	Teste da homogeneidade das variâncias dos oocistos de ANKA e de ANKA-GFP, subgrupo sem tratamento.....	xxxi
16 –	Sumário do teste de hipóteses para amostras independentes Kruskal-Wallis na análise dos oocistos dos grupos ANKA e ANKA-GFP.....	xxxi
17 –	Número de oocistos por intestino-médio de mosquito no ensaio dos primacenos.....	xxxii
18 –	Estatística descritiva dos resultados dos oocistos no ensaio dos primacenos.....	xxxvi
19 –	Teste da normalidade para os oocistos no ensaio dos primacenos.....	xxxviii
20 –	Teste da homogeneidade das variâncias dos oocistos no ensaio dos primacenos.....	xxxviii
21 –	Sumário do teste de hipóteses para amostras independentes Kruskal-Wallis na análise dos oocistos no ensaio dos primacenos.....	xxxviii

Lista de Siglas e Abreviaturas

ANKA	- Grupo infectado com <i>P. berghei</i> ANKA
ANKA-GFP	- Grupo infectado com <i>P. berghei</i> ANKA-GFP
Fc	- Ferroceno
FePP-IX	- Ferriprotoporfirina-IX
g	- Grama
G6PD	- Glucose-6-fosfato desidrogenase
GFP	- Proteína fluorescente verde
hpi	- Hora pós-infecção
IC50	- Concentração de fármaco necessária para inibir 50% dos parasitas
IHMT	- Instituto de Higiene e Medicina Tropical
INTI	- Intensidade de Infecção
IP	- Intraperitoneal
kg	- Quilograma
M	- Número total de eritrócitos
mg	- Miligrama
n	- Número de eritrócitos parasitados
nm	- Nanometro
μM	- micromole por decímetro cúbico
OMS	- Organização Mundial de Saúde
<i>P.</i>	- <i>Plasmodium</i>
P%	- Parasitemia
PBS	- Tampão salino de fosfato
Pc	- Primaceno
Pc10	- Primaceno a 10 μmol/ kg
Pc50	- Primaceno a 50 μmol/ kg
PQ	- Primaquina
PQ10	- Primaquina a 10 μmol/ kg
PQ50	- Primaquina a 50 μmol/ kg
STRAT	- Grupo sem tratamento
T	- Número de mosquitos com ovos
TI	- Taxa de infecção
x	- Número de mosquitos com ovos e com um ou mais oocistos
μl	- Microlitro
μmol	- Micromole
%	- Por cento, percentagem
°C	- Graus Celsius

I. Introdução

I.1 Importância Médica e Epidemiológica da Malária

A malária é uma das principais causas de morte por doença infecciosa em todo o mundo, tendo particular importância na região subsaariana africana, no sudeste asiático e na América do Sul (Figura 1) (Organização Mundial de Saúde (OMS)^a, 2010).

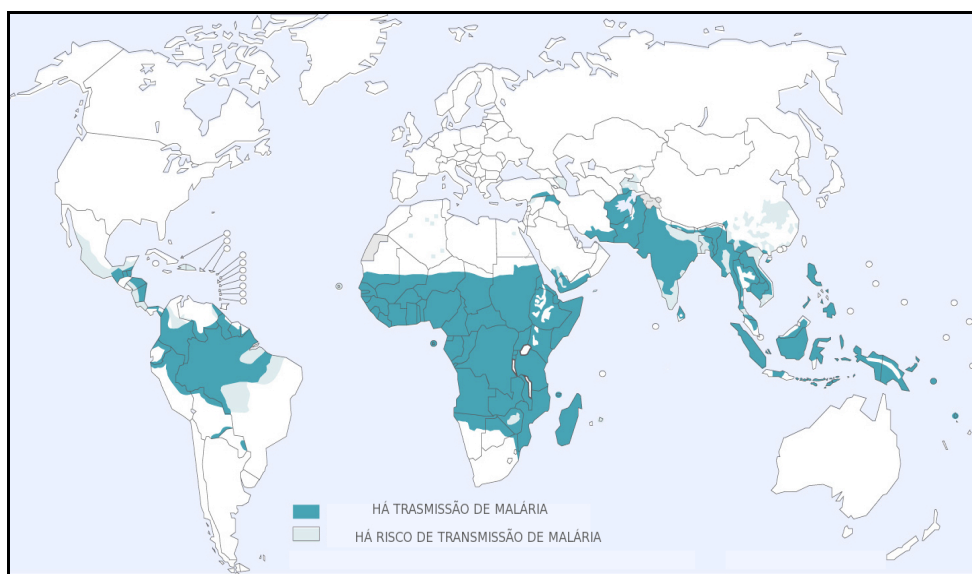


Figura 1 – Distribuição mundial da malária.

Fonte: Adaptado de Organização Mundial de Saúde (OMS)^b, 2010.

De acordo com a publicação *World Malaria Report 2010*, em 2009 a malária foi responsável por 225 milhões de casos de doença e 781 mil mortes em todo o mundo. Os grupos mais atingidos são as mulheres grávidas, os doentes infectados com o vírus da imunodeficiência humana, os viajantes e/ ou os turistas e, principalmente, as crianças onde a taxa de mortalidade por malária ronda os 85% (Bryce *et al.*, 2005; Buonsenso *et al.*, 2010; OMS_a, 2010).

I.2 Ciclo de Vida do Parasita

O agente patogénico causador da malária é um protozoário do género *Plasmodium*. É um parasita intracelular de eritrócitos de mamíferos, aves ou répteis e é transmitido por fêmeas de culicídeos, vulgarmente conhecidos por mosquitos, do género *Anopheles*. Reproduz-se sexuadamente no mosquito-vector (fase esporogónica) e de forma assexuada no hospedeiro vertebrado (fase esquizogónica hepática e eritrocitária) (Figura 2).

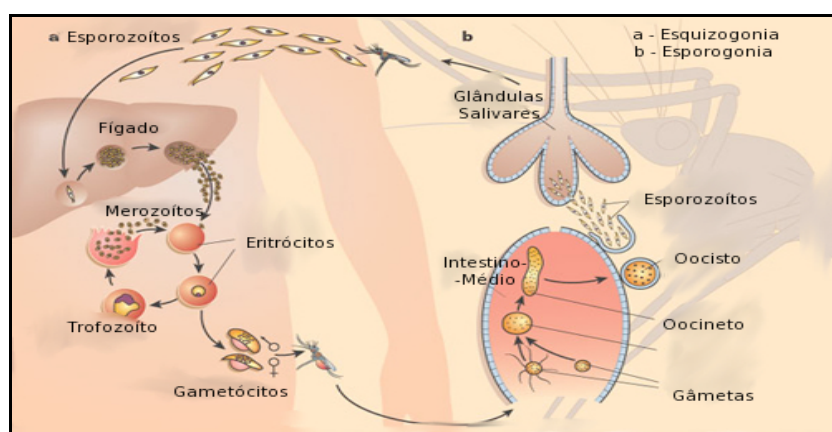


Figura 2 – Ciclo de vida do parasita causador da malária.

Fonte: Adaptado de Ménard, 2005.

As cinco espécies patogénicas para o homem são *Plasmodium (P.) falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*. Em relação a *P. ovale*, um estudo recente (Sutherland, 2010) revelou que o que se pensava ser uma espécie são duas subespécies: *P. ovale curtisi* e *P. ovale wallikeri*. A espécie *P. knowlesi* foi identificada, também recentemente, na ilha de Bornéu e na península da Malásia; até então estava associada a casos de malária em símios e crê-se que tem sido confundida com *P. malariae* (Cox-Singh *et al.*, 2008).

I.2.1 Fase Esporogónica

Quando a fêmea anofelínea efectua uma refeição sanguínea, num indivíduo infectado, ingere eritrócitos parasitados por gametócitos que no interior do mosquito diferenciam-se em gâmetas: o gâmeta masculino designa-se por microgâmeta e o feminino por macrogâmeta (Ghosh *et al.*, 2000; Alavi *et al.*, 2003).

No lúmen do intestino-médio do mosquito ocorre a exflagelação do microgâmeta, *i.e.*, o gâmeta masculino sofre três divisões nucleares formando-se oito núcleos, cada um dos quais com um flagelo. Com o movimento dos flagelos, o microgâmeta vai ao encontro do macrogâmeta ocorrendo a fecundação com a formação do zigoto que é a única forma diplóide em todo o ciclo de vida do parasita (Butcher *et al.*, 1996; Sinden, 2002; Alavi *et al.*, 2003).

O zigoto transforma-se em oocineto que se vai alocar na parede do intestino-médio do mosquito onde sofre meiose, passando a designar-se por oocisto. O oocisto, após várias divisões mitóticas, forma os esporozoítos (formas infectantes do hospedeiro vertebrado) que migram para as glândulas salivares (Sinden *et al.*, 1985; Ghosh *et al.*, 2000).

I.2.2 Fase Esquizogónica Hepática

O mosquito infectado, durante a hematofagia, inocula os esporozoítos no hospedeiro vertebrado. Depois, através da circulação sanguínea (80%) e linfática (20%), estes parasitas vão infectar os hepatócitos, ficando alojados no interior de um vacúolo parasitóforo, onde por mitose se dividem em vários merozoítos; ao conjunto dá-se o nome de esquizonte hepático (Rosenberg *et al.*, 1990; Krettli e Dantas, 2000; Barnwell, 2001).

Com a ruptura do esquizonte hepático, são libertados na corrente sanguínea vários merossomas que são pequenas vesículas formadas a partir da membrana plasmática da célula hepática do hospedeiro e que contêm vários merozoítos no seu interior. Os merozoítos vão em seguida infectar os eritrócitos (Shortt *et al.*, 1948; Mota *et al.*, 2004; Baer *et al.*, 2007).

Nas espécies *P. vivax* e *P. ovale*, alguns dos esporozoítos em vez de evoluírem para esquizontes hepáticos permanecem em estado de latência, designando-se por hipnozoítos. Esse estado poderá durar desde semanas a anos e, ao fim desse tempo, podem ser reactivados provocando uma recaída (Krotoski *et al.*, 1980, Krotoski *et al.*, 1982; Wells *et al.*, 2010).

I.2.3 Fase Esquizogónica Eritrocitária



Figura 3 – Invasão de um eritrócito por um merozoíto.
A imagem não está à escala real. Fonte: Knell, 1991.

Após invadirem os eritrócitos (Figura 3), os merozoítos diferenciam-se em trofozoítos que quando jovens são designados por formas em anel. O parasita consome a hemoglobina, aumenta de tamanho e, à semelhança do que acontece nos hepatócitos, origina merozoítos passando a designar-se por esquizonte eritrocitário. Com a ruptura do esquizonte, os merozoítos são lançados novamente na circulação sanguínea, indo parasitar novos eritrócitos (Bannister *et al.*, 2000; Serebrennikova *et al.*, 2010).

Depois de uma série de ciclos assexuados, uma parte dos merozoítos evolui para formas sexuadas e infectantes para o mosquito-vector que são os gametócitos (Lobo e Kumar, 1998).

I.3 Aspectos Relevantes do Vector

Quer os mosquitos machos, quer as fêmeas, alimentam-se da seiva elaborada de plantas. Contudo, só as fêmeas é que são ectoparasitas, realizando a hematofagia de modo a terem o suporte proteico necessário para a maturação dos ovos (Briegel, 1985; Clements, 1992; Fernandes e Briegel, 2005).

A oviposição e o desenvolvimento larvar e pupal ocorrem em meio aquático. Na subfamília Anophelinae, à qual pertence o género *Anopheles*, os machos e as fêmeas podem ser distinguidos, por exemplo, através da morfologia das antenas; os machos possuem antenas plumosas, enquanto que as fêmeas têm-nas pilosas (Figura 4) (Knell, 1991).



Figura 4 – Esquema da cabeça de um macho e de uma fêmea anofelínea.
As antenas do macho são plumosas, à esquerda, e as da fêmea são pilosas, à direita. Fonte: Knell, 1991.

I.4 Tratamento da Malária: A Importância da Primaquina

A malária é o produto dos efeitos directos da invasão dos eritrócitos pelo parasita assexuado e da reacção do hospedeiro ao agente patogénico em causa. Os sinais e os sintomas surgem entre uma semana a um mês, após a picada infectante, e na fase inicial poderão ser inespecíficos e confundidos com a síndrome gripal (Russel, 1943, White e Breman, 2006; White, 2009).

Na malária grave, tanto a causada por *P. vivax* (Kochar *et al.*, 2010), como por *P. falciparum*, poderá ser desencadeado um quadro de malária cerebral, assim como a falência de órgãos vitais, tais como os rins e o fígado, que elevam a taxa de mortalidade associada a esta doença (Phillips e Warrell, 1986; Thiam *et al.*, 2002; White e Breman, 2006; White, 2009).

Até à 1.^a Guerra Mundial, os alcalóides da *Cinchona*, em particular a quinina, eram os únicos antimaláricos utilizados no tratamento desta doença. Só a partir dessa altura é que houve um grande envolvimento das várias potências económicas no desenvolvimento de anti-infecciosos (Teixeira, 2006; França *et al.*, 2008). A seguir, estão resumidos os principais fármacos disponíveis para uso clínico (Tabela 1 e Figura 5).

Tabela 1 – Principais antimaláricos utilizados na prática clínica.

Fonte: Adaptado de OMS, 2010.

FAMÍLIA QUÍMICA		FÁRMACO(S)
Derivados da quinolina	Alcalóides da Cinchona	Quinina (Figura 5 – b), Quinidina, Mefloquina
	4-aminoquinolinas	Cloroquina (Figura 5 – e), Amodiaquina, Piperaquina
	8-aminoquinolinas	Primaquina (Figura 5 – d)
Derivados do fenantreno-metanol		Halofantrina (Figura 5 – f), Lumefantrina
Inibidores da redutase do ácido láctico	Biguanidas	Proguanilo (Figura 5 – g) e Cloroproguanilo
	Diaminopirimidinas	Pirimetamina (Figura 5 – h)
Antagonistas do ácido p-aminobenzoico	Sulfonas	Dapsona
	Sulfonamidas	Sulfadiazina e Sulfadoxina (Figura 5 – j)
Antibióticos		Doxiciclina (tetraciclina) (Figura 5 – k), Azitromicina (macrólide) e Clindamicina (lincosamida)
Hidroxi-naftoquinona		Atovaquona (Figura 5 – i)
Lactonas Sesquiterpénicas		Artemisinina (Figura 5 – l) e derivados: Arteeter, Artemeter, Artesunato, Dihidroartemisinina

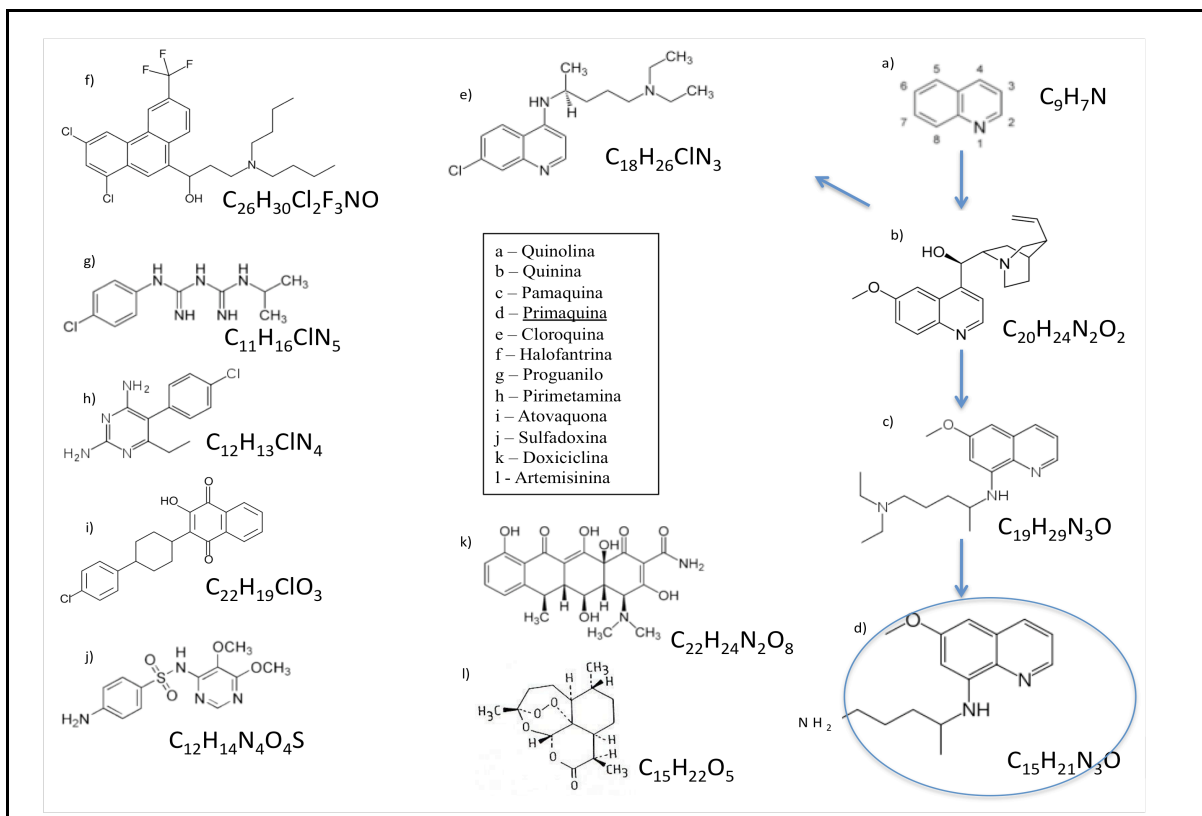


Figura 5 – Fórmulas moleculares e químicas de alguns antimaláricos.

Fonte: Elaborado pelo autor a partir de Google Imagens (2011).

A quinolina (Figura 5 – a) é um composto orgânico aromático bicíclico, derivado do naftaleno, mas que na posição 1 tem um átomo de carbono substituído por um átomo de nitrogénio. Modificações nesta molécula conduziram à síntese de várias outras substâncias, em particular as aminoquinolinas. Em 1920 foi sintetizada a primeira 8-aminoquinolina, a pamaquina (Figura 5 – c), e em 1934 a primeira 4-aminoquinolina, a cloroquina. Já em 1946, a partir da pamaquina, foi produzida a primaquina (PQ) que à semelhança do seu precursor também é uma 8-aminoquinolina (Peters, 1973; López-Antuñano, 1999).

O nome químico da PQ é 8-[(4-amino-1-metilbutil)amino]-6-metoxiquinolina. Contém um anel duplo quinolínico que na posição 8 tem um grupo amina secundário e na posição 6 tem um grupo metoxilo.

Pensa-se que o mecanismo de acção das quinolinas, em geral, e da PQ, em particular, envolve sobretudo a inibição da polimerase ferriprotoporfirina-IX (FePP-XI). Contudo, ainda não está totalmente esclarecido (López-Antuñano, 1999; Baird e Rieckmann, 2003; França *et al.*, 2008, Basso *et al.*, 2011). Ao ligarem-se à FePP-IX que é o grupo heme da hemoglobina vão impedir a polimerização pela polimerase FePP-IX (Vennerstrom *et al.*, 1999). Ora, a polimerização é um mecanismo de desintoxicação do parasita, através do qual ele converte a FePP-IX que é tóxica em hemozoína que é não tóxica (França *et al.*, 2008).

A PQ é eficaz contra as formas intra-hepáticas e eritrocitárias, bem como contra as formas sexuadas (Arnold *et al.*, 1955; Pukrittayakamee *et al.*, 2004). É de salientar que é o único fármaco hipnozoitocida que está actualmente disponível (Krotoski *et al.*, 1986; Baird e Rieckmann, 2003; Baird e Hoffman, 2004). Para além disso, continua a ser o gametocitocida de eleição, sendo até recomendada a sua utilização em terapia combinada com a artemisinina e derivados uma vez que estes, apesar de também serem gametocitocidas, parecem ter fraca actividade contra os gametócitos maduros (Pukrittayakamee *et al.*, 2004).

O principal esquema terapêutico diário com a PQ consiste em 0,25 miligrama (mg) por quilograma (kg) durante 14 dias, sendo bem absorvida por via oral, atingindo a concentração plasmática máxima ao fim de uma a duas horas (Mihaly *et al.*, 1984). Contudo, esta concentração rapidamente diminui devido quer à acumulação nos vários órgãos, quer à sua rápida metabolização hepática e eliminação renal, apresentando um tempo de semi-vida entre as três e as seis horas (Fletcher *et al.*, 1981).

Durante a metabolização, formam-se vários metabolitos activos (6-metoxi-8-aminoquinolina e carboxiprimaquina, *e.g.*) que provocam efeitos gastrointestinais e hematológicos no doente. Os efeitos gastrointestinais poderão ser atenuados se a administração da PQ for feita durante ou após uma refeição (Baird e Hoffman, 2004).

Os dois principais efeitos hematológicos são a conversão da oxi-hemoglobina em metemoglobina (incapaz de transportar o oxigénio), com consequente aumento dos níveis séricos desta última (Coleman e Coleman, 1996; Strother *et al.*, 1984; Baird e Hoffman, 2004; Kaur *et al.*, 2007) e, em pessoas com deficiência congénita em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), ou com outras hemoglobinopatias, a hemólise com consequente anemia hemolítica (Chan *et al.*, 1976).

Tendo presente a fraca actividade da PQ como esquizonticida sanguíneo, sobretudo em *P. falciparum*, o tempo de semi-vida baixo e a toxicidade inerente, assim como a problemática generalizada do aumento de microrganismos resistentes a anti-infecciosos, nomeadamente aos antimaláricos de primeira linha como a artemisinina e seus derivados (Enserink, 2008), considera-se necessário implementar estratégias de melhoramento do índice terapêutico da PQ, nomeadamente através da concepção de derivados, dado que este fármaco reúne características ímpares, tais como a sua actividade hipnozoitocida e gametocitocida, e que o poderão tornar num adjuvante sem igual no controlo e na eliminação da malária (Jain *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2005; White, 2008; Vale *et al.*, 2009; Vale *et al.*, 2009_b).

Existem duas vias fundamentais para modificar a estrutura química da PQ. A primeira consiste em introduzir radicais no duplo anel quinolínico e a segunda em modificar o grupo amina terminal (Ridley e Hudson, 1998; Vale *et al.*, 2009). São exemplos a tafenoquina e a bulaquina, dois análogos da PQ.

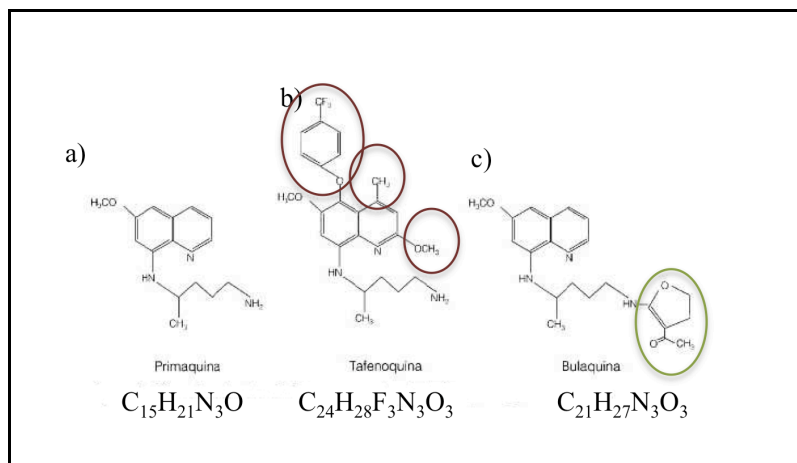


Figura 6 – Estrutura molecular e fórmula química da tafenoquina e da bulaquina.

No interior dos círculos temos as alterações feitas na molécula parental, a primaquina: na tafenoquina temos a introdução de radicais no duplo anel quinolínico, nas posições 2, 4 e 5, e na bulaquina temos a modificação do grupo amina terminal. Fonte: Adaptado de Pérez, 2004.

A tafenoquina (WR-238605 ou SB-252263) (Figura 6 – b) demonstrou ter menores efeitos secundários gastrointestinais, um tempo de semi-vida de 14 dias e uma actividade contra as principais espécies que causam malária humana, inclusivamente como esquizonticida sanguíneo. Todavia, ainda não é totalmente sabido se provoca ou não metemoglobinemia e anemia hemolítica (Brueckner *et al.*, 1998; Vennerstrom *et al.*, 1999; Nasveld *et al.*, 2005). A bulaquina (elubiquina ou CDRI 80/53) (Figura 6 – c), apesar dos resultados até então revelarem que tem uma actividade gametocitocida superior à da PQ, é instável nos solventes orgânicos mais comuns, o que poderá limitar a sua produção (Srivastava *et al.*, 1992; Lal *et al.*, 2003; Puri e Dutta, 2005).

A adição da molécula ferroceno (Fc) a antimaláricos tem vindo a ser usada para desenvolver derivados com um melhor perfil farmacológico, de que é exemplo a ferroquina obtida a partir da cloroquina (Delhaes *et al.*, 2002; Dive e Biot, 2008; Matos *et al.*, 2010). O Fc é um caso particular do grupo dos metallocenos que são complexos organometálicos, tendo a fórmula química $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ e, estruturalmente, é uma molécula do tipo *sandwich*, *i.e.*, tem um átomo de ferro no meio de dois anéis ciclopentadienil (Astruc, 2000; van Staveren e Metzler-Nolte, 2004; Chavain e Biot, 2010).

Em 2009 foi sintetizada a primeira geração de conjugados PQ-Fc designados por primacenos, obtidos a partir da adição do ácido ferrocenocarboxílico (com um ferroceno) ao grupo amina terminal da PQ sem introduzir alterações ao nível dos anéis quinolínicos (Figura 7) (Matos *et al.*, 2010).

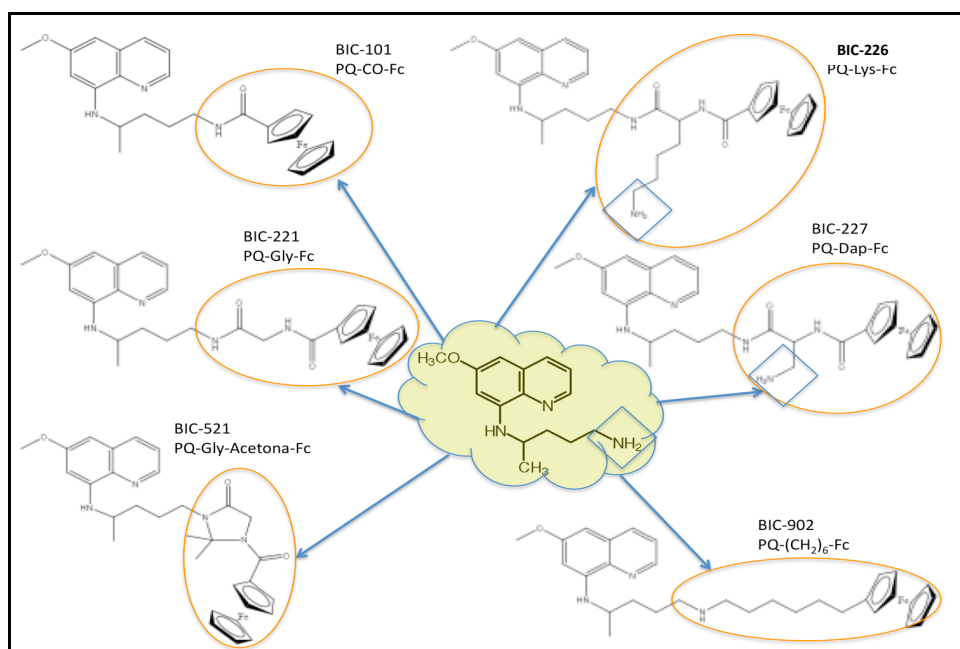


Figura 7 - Estruturas moleculares dos primacenos.
 Fonte: Elaborado pelo autor a partir de Gomes *et al.*, 2010.

II. Objectivos

Foram postulados os seguintes objectivos para esta investigação:

Objectivo 1: Implementar um novo modelo murino para estudos de bloqueio de transmissão do parasita ao vector, baseado na utilização da proteína fluorescente verde.

Objectivo 2: Avaliar a actividade gametocitocida de primacenos.

Os primacenos foram sintetizados no Centro de Investigação Química da Universidade do Porto, sob a orientação da Professora Doutora Paula Gomes, no âmbito dos projectos de síntese e de estudo de potenciais pró-fármacos da primaquina: PTDC/QUI/65142/2006 e FCOMP-01-0124-FEDER-007418.

III. Material e Métodos

III.1 Material Biológico

III.1.1 Parasitas

Foram utilizadas duas estirpes parasitas de roedores, *P. berghei* ANKA (da colecção da unidade de ensino e investigação de parasitologia médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT) da Universidade Nova de Lisboa) e *P. berghei* ANKA-GFP (cedida por Nicholas White do Centro Médico Universitário de Leiden, Holanda).

P. berghei ANKA-GFP é um clone transgénico de *P. berghei* ANKA que possui o gene que codifica para a proteína fluorescente verde (GFP). Uma vez que este parasita possui quatro cópias distintas do ácido ribonucleico ribossomal (a, b, c, d), o gene da GFP foi integrado no genoma do parasita no gene que codifica para a cópia c, dado que é considerado não essencial para o desenvolvimento do parasita (van Spaendonk *et al.*, 2001; Franke-Fayard, 2004).

A GFP existe no cnidário *Aequorea victoria* e é responsável pela bioluminescência observada neste animal (Shimomura *et al.*, 1962; Cody *et al.*, 1993). O espectro de emissão da GFP situa-se entre os 505 e os 540 nanometro (nm), correspondendo à luz verde da radiação visível (Tsien, 1998).

III.1.2 Murganhos

Os murganhos utilizados na experiência, provenientes do biotério do IHMT, foram fêmeas da linhagem BALB/c, com idades compreendidas entre as seis e as oito semanas, e com um peso aproximado de 20 ± 2 grama (g).

III.1.3 Mosquitos

Foram utilizadas fêmeas entre os três e os seis dias de vida, após terem transitado do estado pupal para o estado adulto, pertencentes à espécie *Anopheles stephensi* e obtidas no insectário do IHMT.

III.2 Descrição das Técnicas

III.2.1 Infecção dos Murganhos

Os murganhos foram infectados pela via intraperitoneal (IP) com 10^7 eritrócitos parasitados em 100 microlitros (μ l) de mistura de sangue e tampão salino de fosfato (PBS). Durante a actividade experimental, permaneceram no biotério do IHMT em condições climáticas e de nutrição adequadas, de acordo com as normas comunitárias relativas ao bem-estar dos animais de experiência (Directiva N.º 86/ 609/ CEE), transpostas para a legislação nacional (Decreto-Lei N.º 129/ 92, 6 de Julho, e Portaria N.º 1005/ 92, 23 de Agosto).

III.2.2 Determinação da Parasitemia

A partir da leitura dos esfregaços sanguíneos, fixados com metanol e corados com Giemsa a 20 por cento (%) em água tamponada, por microscopia óptica na objectiva de ampliação 100x, contou-se o número de eritrócitos parasitados (n) e o número total de eritrócitos (M) em dez campos de observação distintos. O valor da parasitemia ($P\%$) foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$P\%(\%) = 100 \times \frac{n}{M}$$

III.2.3 Observação da Exflagelação

Procedeu-se à colheita de sangue através da veia da cauda do murganho, colocou-se uma gota entre lâmina e lamela e passados 15 minutos observou-se o movimento dos flagelos dos gametócitos masculinos, por microscopia óptica na objectiva de ampliação 40x.

III.2.4 Alimentação dos Mosquitos

Duas horas após a administração dos compostos, os murganhos foram anestesiados pela via IP com 100 μ l da seguinte mistura: 75% de PBS, 20% de cetamina e 5% de xilazina a 2%. Cada murganho foi usado para alimentar 50 mosquitos durante uma hora. Finda a alimentação, os mosquitos ficaram alojados no insectário do IHMT com a temperatura ambiente entre os 19 e os 21 graus Celsius ($^{\circ}$ C), o fotoperíodo de 12 horas e a alimentação com solução aquosa de glucose a 10%.

III.2.5 Dissecção dos Mosquitos

Os mosquitos foram colocados a -20°C , durante 5 minutos, e depois em álcool etílico a 70 graus durante alguns segundos e de seguida em PBS. Sobre uma lâmina, procedeu-se à dissecção tal como mostra o seguinte esquema (Figura 8).

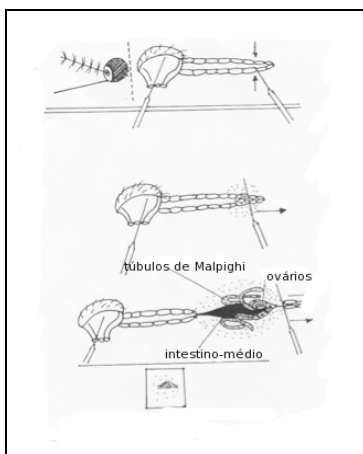


Figura 8 - Esquema da dissecção do mosquito para extracção do intestino-médio.
Fixa-se o tórax e, com uma ligeira pressão sobre o penúltimo segmento abdominal, faz-se deslizar rapidamente, no sentido distal, de modo a puxar o intestino-médio.

III.3 Metodologia

III.3.1 Implementação de um Novo Modelo Murino

Os animais foram divididos de forma aleatória em dois grupos: grupo infectado com *P. berghei* ANKA (ANKA) e grupo infectado com *P. berghei* ANKA-GFP (ANKA-GFP), de acordo com o que está esquematizado na seguinte tabela (Tabela 2).

Tabela 2 – Ensaios realizados no estudo do novo modelo murino.

GRUPO	SUBGRUPO	N.º DE MURGANHOS
ANKA	Não tratado/ controlo negativo	3
	Tratado com PQ a 10µmol/ kg	3
	Tratado com PQ a 50µmol/ kg	3
ANKA-GFP	Não tratado/ controlo negativo	3
	Tratado com PQ a 10µmol/ kg	3
	Tratado com PQ a 50µmol/ kg	3

µmol = micromole

Procedeu-se à infecção dos murganhos, tendo em atenção o grupo a que pertenciam. Foi determinada a parasitemia ao longo dos quatro dias pós-infecção. Ao quarto dia, observou-se a exflagelação e só os animais em que esta foi confirmada é que continuaram na experiência. Em seguida, procedeu-se à administração dos compostos, pela via IP, em conformidade com o subgrupo em que estavam inseridos. Decorridas duas horas foram usados para alimentar os mosquitos.

Dez dias após a refeição sanguínea, os mosquitos foram dissecados. Efectuou-se a contagem do número de oocistos através da leitura por microscopia óptica, na ampliação 40x, para o grupo ANKA e por microscopia de fluorescência, na objectiva de ampliação 10x, para o grupo ANKA-GFP. Só foram incluídos no estudo os mosquitos que tinham ovos, tanto para o cálculo da taxa de infecção (TI), como para o cálculo da intensidade de infecção (INTI). Para além disso, só foram contados até 120 oocistos por mosquito, uma vez que a partir deste valor tornou-se difícil garantir o rigor da contagem.

A TI foi calculada a partir da seguinte fórmula, com x igual ao número de mosquitos com um ou mais oocistos no intestino-médio e com T igual ao número total de mosquitos:

$$TI(\%) = \frac{x}{T} \times 100$$

A INTI foi avaliada através da média de oocistos por mosquito, do respectivo desvio-padrão e do intervalo de confiança a 95%.

III.3.2 Avaliação da Actividade Gametocitocida de Primacenos

Foram analisados seis primacenos, BIC-101, BIC-221, BIC-521, BIC-226, BIC-227 e BIC-902. Para cada substância, os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, de acordo com o esquematizado na seguinte tabela (Tabela 3) e a metodologia é similar à descrita em III.3.1.

Tabela 3 - Ensaios realizados no estudo dos primacenos.

GRUPO		N.º DE MURGANHOS
Não tratado/ controlo negativo		3*
Tratado com PQ/ controlo positivo	10µmol/ kg	3*
	50µmol/ kg	3*
Tratado com Primaceno	10µmol/ kg	3
	50µmol/ kg	3

**Foram utilizados os resultados obtidos com P. berghei ANKA-GFP em III.3.1.*

III.4 Análise Estatística

A análise das variáveis em estudo foi realizada através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Anexos 1, 2 e 3). Os cálculos foram feitos utilizando o programa SPSS versão 19.0.

IV. Resultados

IV.1 Implementação de um Novo Modelo Murino

Nas primeiras 24 horas pós-infecção (hpi) não foram observados trofozoítos no interior, nem no exterior, dos eritrócitos dos murganhos em estudo. Contudo, entre as 48 e as 96 hpi verificou-se um aumento da parasitemia, atingindo esta no quarto dia valores médios compreendidos entre os 22 e os 37% em ANKA e entre os 16 e os 29% em ANKA-GFP (intervalo de confiança de 95% para a média), e em todos os animais foi observada a exflagelação dos microgâmetas (Figura 9 e Anexo 1).

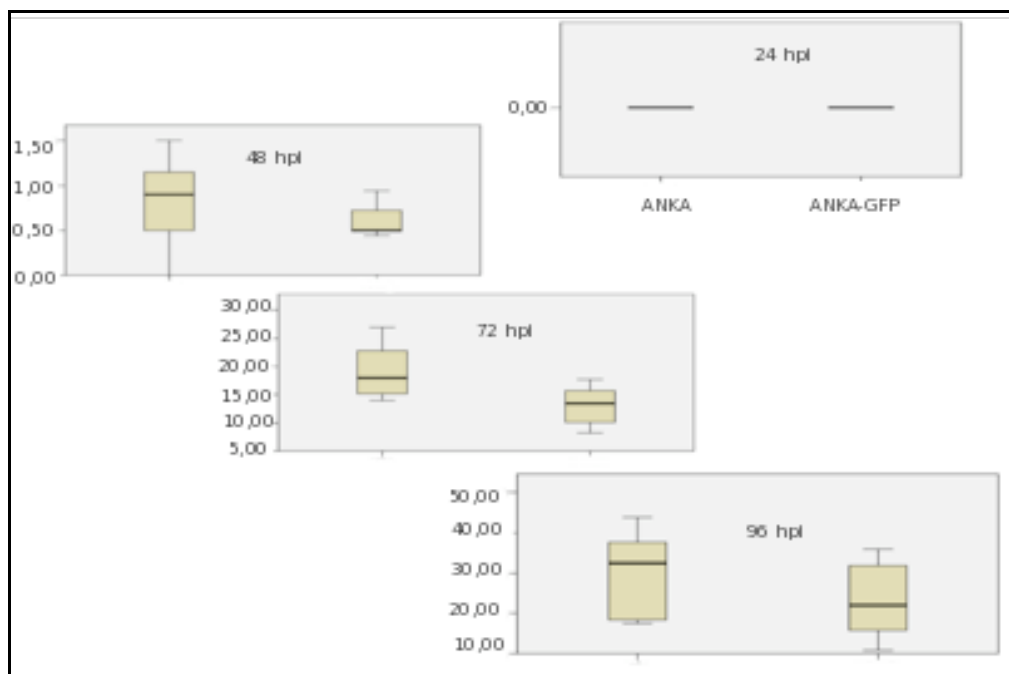


Figura 9 – Distribuição da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.

O número de oocistos observado nos grupos ANKA e ANKA-GFP, assim como a TI dos mosquitos, foi significativamente diferente quando os murganhos não foram sujeitos a nenhum tratamento e quando foram tratados com PQ a 50 $\mu\text{mol/kg}$ (PQ50). No primeiro caso, os valores médios variaram entre os 14 e os 26 oocistos em ANKA e os 64 e os 90 oocistos em ANKA-GFP e a TI foi igual a 79 em ANKA e 90% em ANKA-GFP. Quando tratados com PQ50, o número de oocistos foi praticamente constante (igual a zero) em ANKA e variou entre os 8 e os 30 oocistos em ANKA-GFP e a TI foi 22 em ANKA e 35% em ANKA-GFP.

Quando tratados com PQ a 10 $\mu\text{mol/kg}$ (PQ10), não se observaram diferenças significativas entre os grupos. Em ANKA foram observados entre 2 e 5 oocistos e em ANKA-GFP entre 5 e 18 oocistos (intervalo de confiança de 95% para a média) e a TI foi 44 em ANKA e 41% em ANKA-GFP (Tabela 4, Figura 10 e Anexo 2).

Tabela 4 – Taxa de infecção e intensidade de infecção em ANKA e em ANKA-GFP.

	ANKA			ANKA-GFP		
	sem tratamento	PQ10	PQ50	sem tratamento	PQ10	PQ50
TI	79,439	44,231	22,581	90,476	41,772	35,088
INTI (média e desvio-padrão)	20,495 \pm 33,796	4,000 \pm 9,419	0,495 \pm 1,109	77,048 \pm 51,731	12,139 \pm 28,846	19,754 \pm 41,324
N.º de mosquitos	107	104	93	63	79	57
N.º de mosquitos sem oocistos	22	58	72	6	46	37
N.º de mosquitos com 120 ou mais oocistos	8	0	0	33	4	6

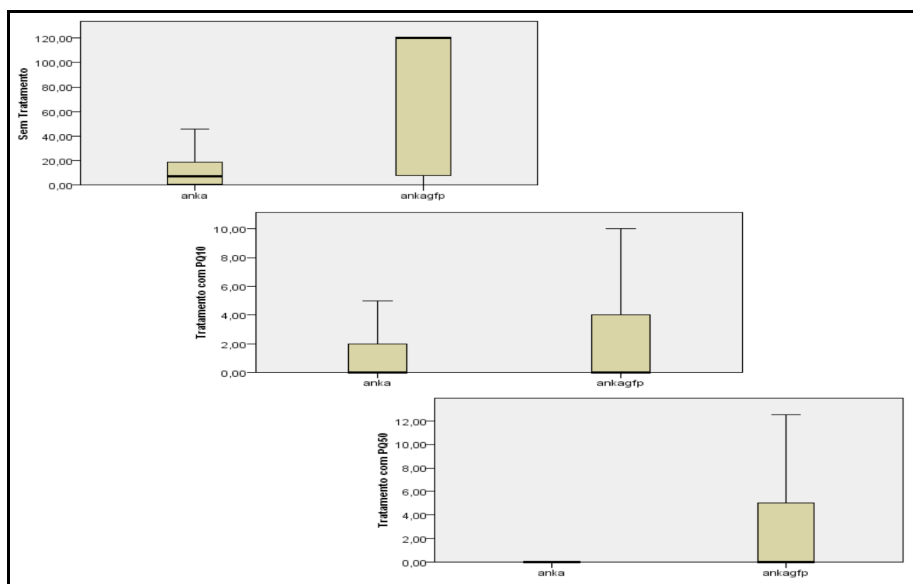


Figura 10 – Distribuição do número de oocistos em ANKA e em ANKA-GFP.

IV.2 Avaliação da Actividade Gametocitocida de Primacenos

Dos seis primacenos analisados, o BIC-221 a 10 $\mu\text{mol/ kg}$ e o BIC-902 a 50 $\mu\text{mol/ kg}$ mostraram ter uma taxa de infecção e uma intensidade de infecção inferiores ao fármaco parental, a primaquina. Inclusivamente, no segundo primaceno mencionado, houve um bloqueio de transmissão de 100% do parasita ao vector, *i.e.*, não foram observados oocistos em todos os intestinos-médios dos mosquitos dissecados (Figura 11, Tabela 5 e Anexo 3).

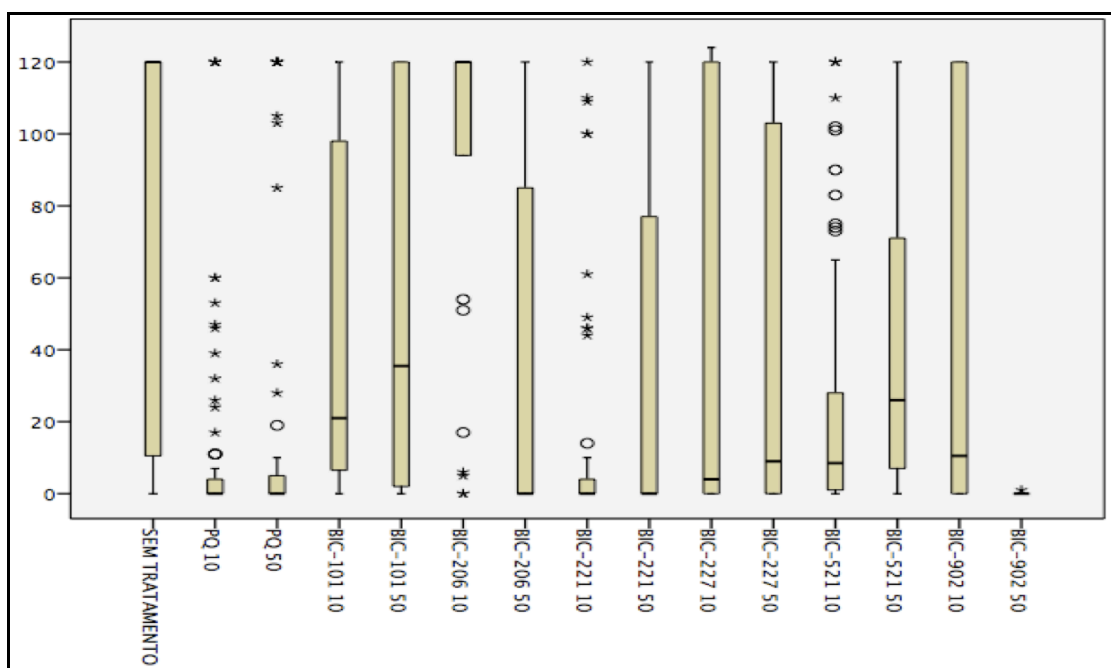


Figura 11 – Distribuição do número de oocistos no ensaio dos primacenos.

Tabela 5 – Taxa de infecção e intensidade de infecção nos primacenos.

	BIC-101		BIC-221		BIC-521		BIC-226		BIC-227		BIC-902	
	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50	10	50
TI	98,505	88,095	33,846	41,758	75,556	86,667	93,333	42,424	68,182	73,196	65,152	0
INTI (média e desvio-padrão)	45,712 ± 46,722	51,000 ± 49,997	13,338 ± 31,565	33,495 ± 49,852	22,811 ± 32,826	41,100 ± 39,867	93,833 ± 43,758	32,485 ± 47,333	43,500 ± 54,114	42,732 ± 50,520	44,167 ± 53,177	0
N.º de mosquitos	59	42	65	91	90	90	30	33	44	97	66	32
N.º de mosquitos sem oocistos	1	5	43	53	22	12	2	19	14	26	23	32
N.º de mosquitos com 120 ou mais oocistos	12	11	0	17	3	7	17	1	11	18	18	0

IV.2.1 BIC-101

Os valores médios da quantidade de oocistos presente em cada intestino-médio variaram entre os 33 e os 57 oocistos a 10 e a 50 $\mu\text{mol/kg}$ entre os 35 e os 66 oocistos (intervalo de confiança da média a 95%). A taxa de infecção foi 98% na dose mais baixa e 88% na dose mais alta e a intensidade de infecção foi significativamente diferente da dos grupos não tratado e tratado com o fármaco parental (Figura 12 e Anexo3).

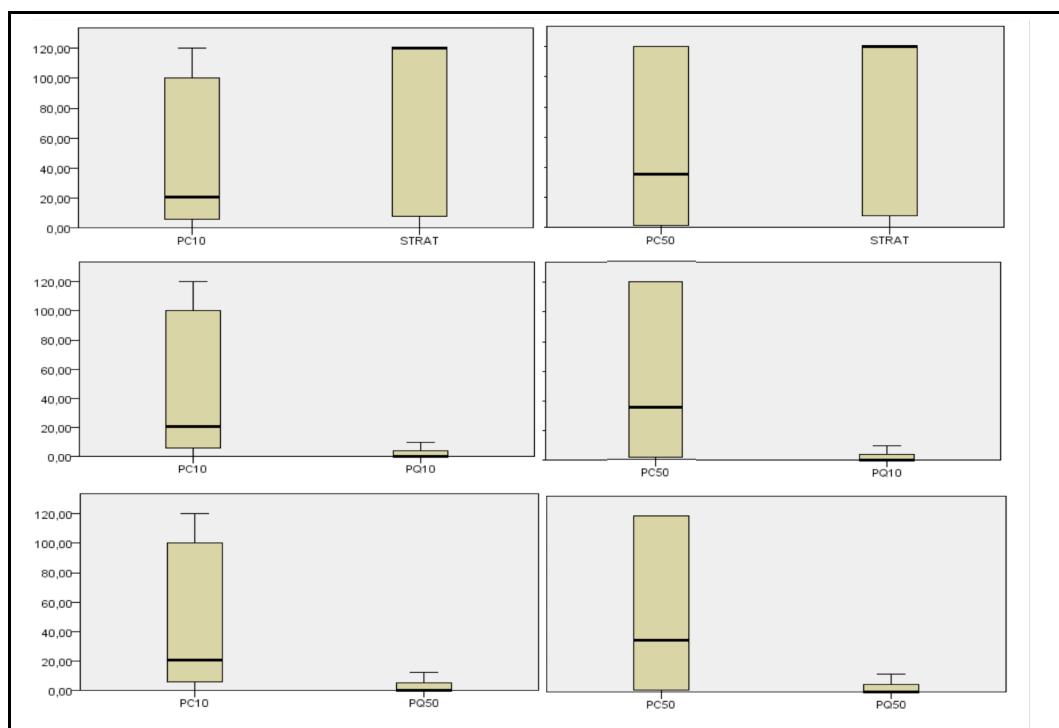


Figura 12 - Distribuição do número de oocistos em BIC-101, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.

Legenda: STRAT = grupo não tratado; PC10 = primaceno a 10 $\mu\text{mol/kg}$; PC50 = primaceno a 50 $\mu\text{mol/kg}$.

IV.2.2 BIC-221

O número de oocistos situou-se entre os 5 e os 21 quando os murganhos foram tratados com 10 $\mu\text{mol/kg}$ e os 23 e os 43 na dose 50 $\mu\text{mol/kg}$ (intervalo de confiança da média a 95%). A taxa de infecção foi 33% na dose mais baixa e 41% na dose mais elevada e a intensidade de infecção não foi considerada significativamente diferente entre os seguintes grupos: PC vs. PQ a 10 $\mu\text{mol/kg}$; PC vs. PQ a 50 $\mu\text{mol/kg}$; PC a 10 $\mu\text{mol/kg}$ vs. PQ a 50 $\mu\text{mol/kg}$; e PC a 50 $\mu\text{mol/kg}$ vs. PQ a 10 $\mu\text{mol/kg}$ (Figura 13 e Anexo 3).

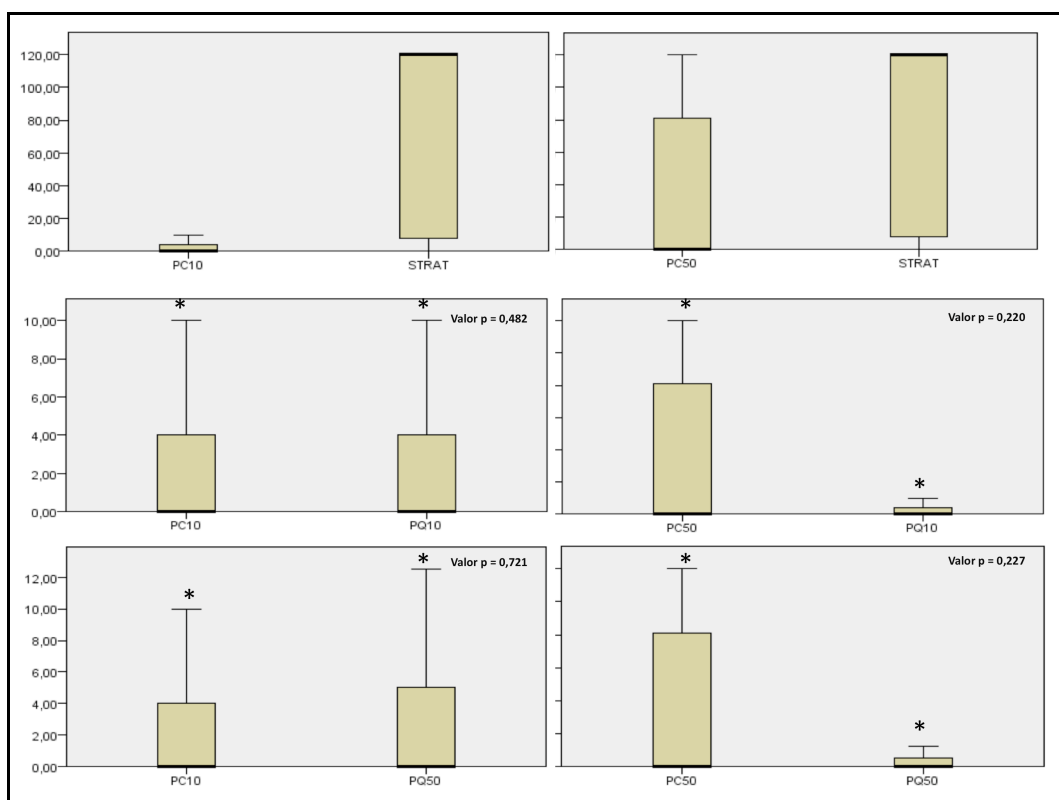


Figura 13 - Distribuição do número de oocistos em BIC-221, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.

IV.2.3 BIC-521

Os valores médios dos oocistos variaram entre os 16 e os 29 oocistos a 10 $\mu\text{mol/ kg}$ e entre os 32 e os 49 oocistos a 50 $\mu\text{mol/ kg}$ (intervalo de confiança da média a 95%). A taxa de infecção foi 75 na dose mais baixa e 86% na dose mais alta e a intensidade de infecção foi significativamente diferente da dos grupos não tratado e tratado com a PQ (Figura 14 e Anexo 3).

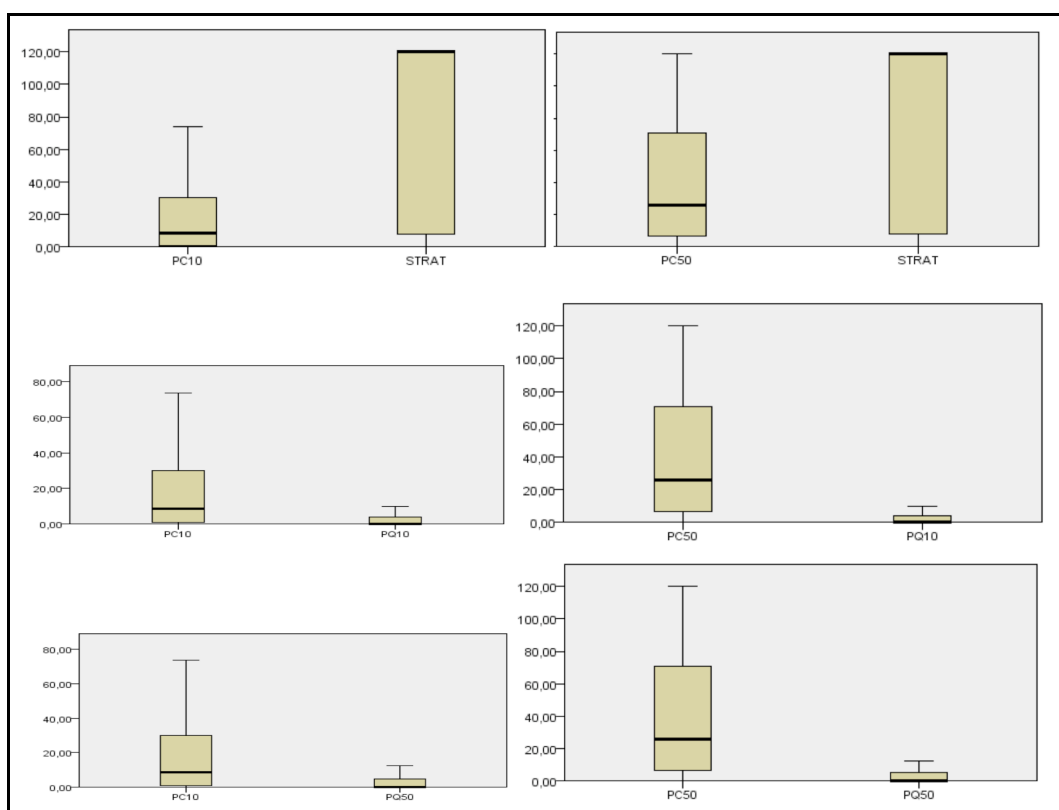


Figura 14 - Distribuição do número de oocistos em BIC-521, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.

IV.2.4 BIC-226

O número de oocistos situou-se entre os 78 e os 109 quando os murganhos foram tratados com 10 $\mu\text{mol/kg}$ e os 16 e os 48 na dose 50 $\mu\text{mol/kg}$ (intervalo de confiança da média a 95%). A taxa de infecção foi 93% na dose mais baixa e 42% na dose mais elevada e a intensidade de infecção não foi considerada significativamente diferente entre os seguintes grupos: PC *vs.* PQ a 50 $\mu\text{mol/kg}$; e PC a 50 $\mu\text{mol/kg}$ *vs.* PQ a 10 $\mu\text{mol/kg}$ (Figura 15 e Anexo 3).

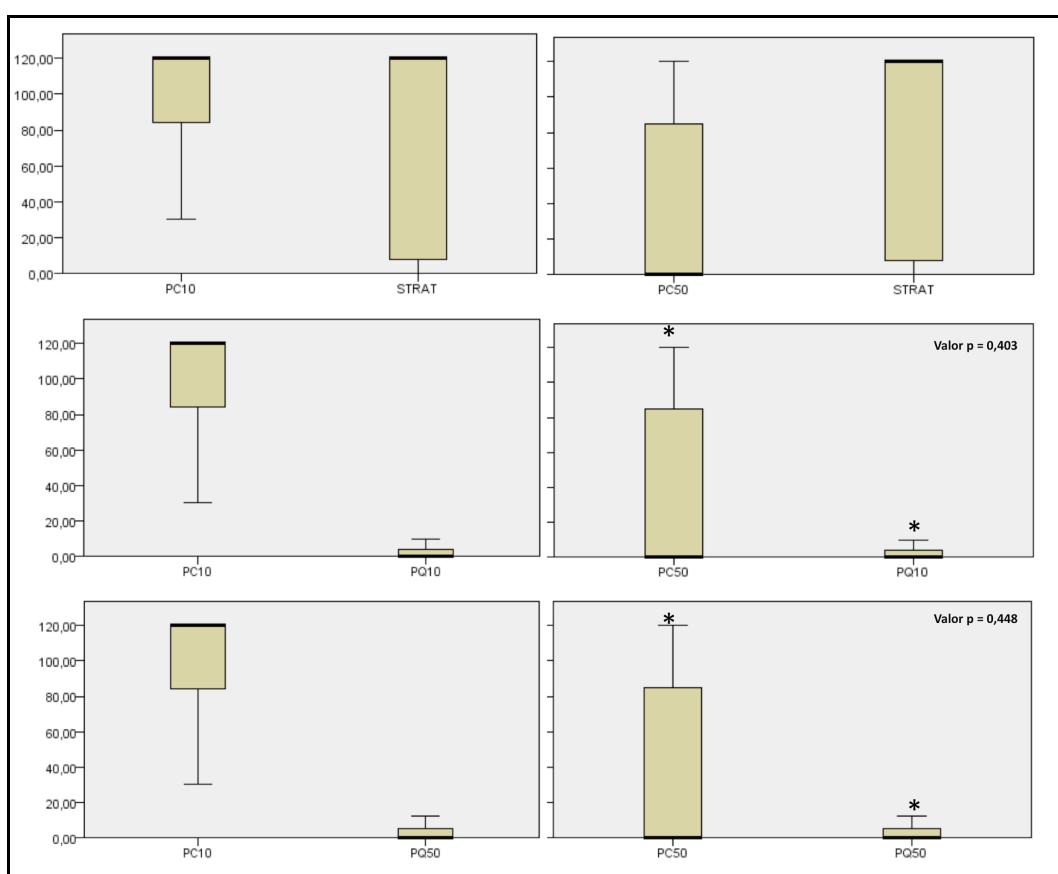


Figura 15 - Distribuição do número de oocistos em BIC-226, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.

IV.2.5 BIC-227

Os valores médios dos oocistos variaram entre os 27 e os 59 oocistos a 10 $\mu\text{mol/kg}$ e entre os 32 e os 52 oocistos a 50 $\mu\text{mol/kg}$ (intervalo de confiança da média a 95%). A taxa de infecção foi 68 na dose mais baixa e 73% na dose mais alta e a intensidade de infecção foi significativamente diferente da dos grupos não tratado e tratado com a PQ (Figura 16 e Anexo 3).

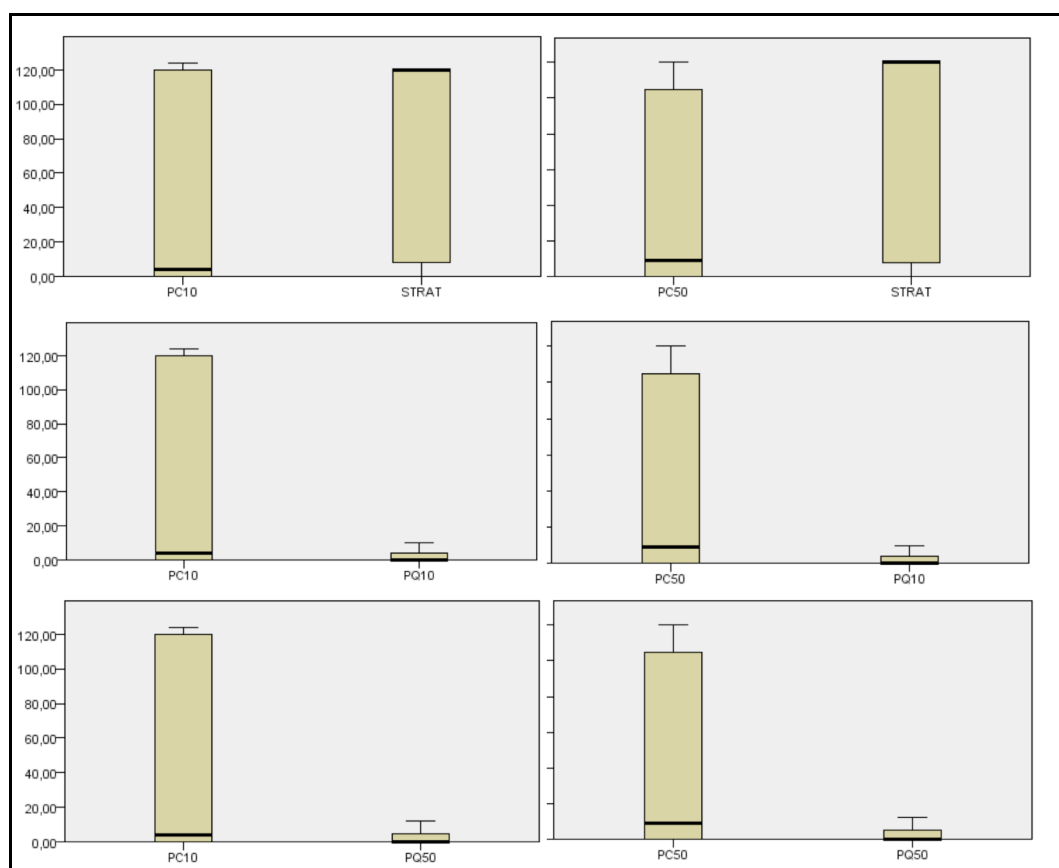


Figura 16 - Distribuição do número de oocistos em BIC-227, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.

IV.2.6 BIC-902

O número de oocistos situou-se entre os 31 e os 56 quando os murganhos foram tratados com 10 $\mu\text{mol/ kg}$ e manteve-se constante, *i.e.*, igual a zero na dose 50 $\mu\text{mol/ kg}$ (intervalo de confiança da média a 95%). A taxa de infecção foi 65% na dose mais baixa e não houve infecção nos mosquitos na dose mais elevada e a intensidade de infecção foi significativamente diferente da dos grupos não tratado e tratado com a PQ (Figura 17 e Anexo 3).

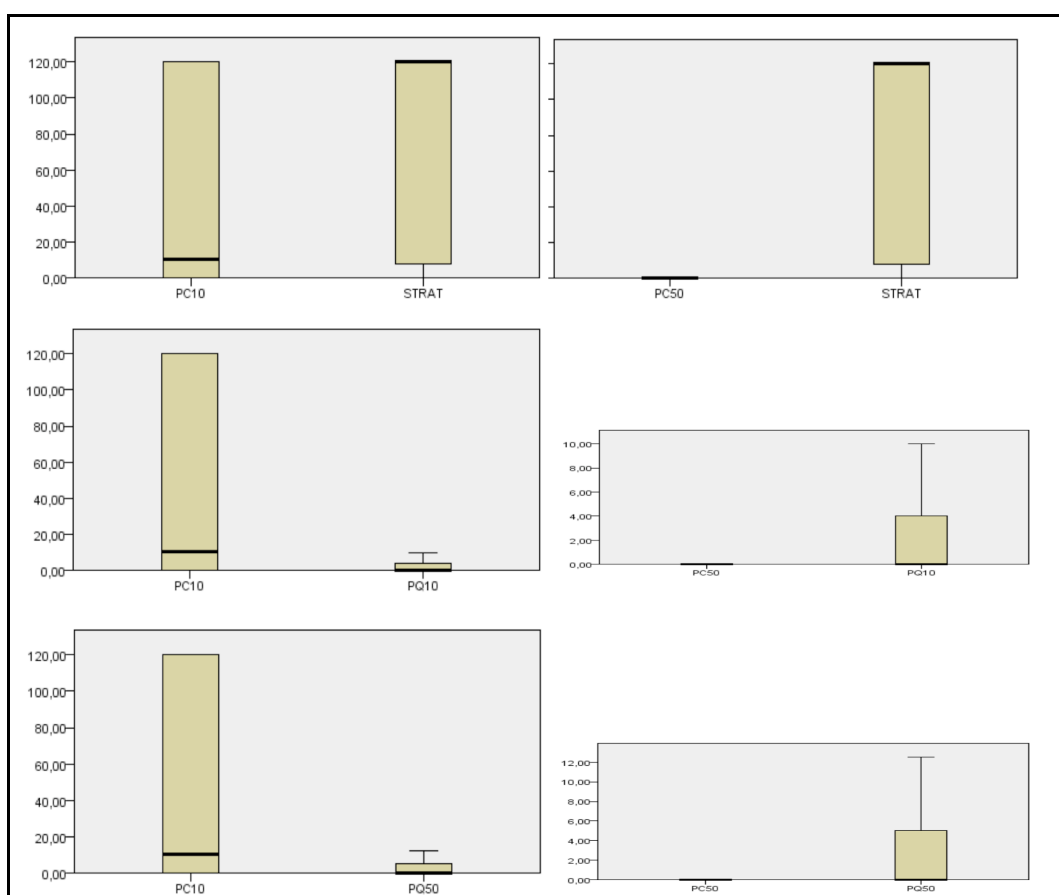


Figura 17 - Distribuição do número de oocistos em BIC-902, no grupo não tratado e no grupo tratado com primaquina.

V. Discussão

V.1 Implementação de um Novo Modelo Murino

O ensaio-padrão para medir factores que afectam a transmissão de *Plasmodium spp* ao mosquito-vector consiste em alimentar grupos de mosquitos em hospedeiros infectados, ou em membranas artificiais com sangue infectado, e depois contar o número de oocistos que se desenvolveu no intestino-médio de cada mosquito (Delves e Sinden, 2010).

A utilização do modelo murino com *P. berghei* assenta sobretudo na analogia entre esta espécie e as que infectam os humanos nos aspectos essenciais tais como a fisiologia e o ciclo de vida do parasita (Carter e Diggs, 1977). *P. berghei* ANKA-GFP expressa a proteína em todo o seu ciclo de vida, havendo um leque variado de possibilidades de utilização e que não se restringe só a estudos de actividade de fármacos gametocitocidas e/ou inibidores do desenvolvimento de oocistos (Franke-Fayard *et al.*, 2004). Esta estirpe tem vindo a ser usada em estudos de bloqueio de transmissão do parasita ao vector (Akaki e Dvorak, 2005; Ramjanee *et al.*, 2007; Delves e Sinden, 2010)

Com o modelo *P. berghei* ANKA, entre os 4 e os 5 dias pós-infecção do murganho (com 10^7 parasitas) observa-se uma parasitemia tipicamente entre os 10 e os 20% e ocorre a exflagelação dos gâmetas masculinos (Fleck *et al.*, 1994; Sinden *et al.*, 1996 e Butcher *et al.*, 1996). No nosso estudo, verificámos estes factos em ambas as estirpes (Figura 9 e Anexo 1).

As elevadas taxas de infecção nos mosquitos alimentados em animais não tratados (Tabela 4, Figura 10 e Anexo 2), indicam que neste período existia um elevado número de gametócitos maduros em circulação no sangue dos murganhos, sendo esta a condição necessária para testar os compostos com efeito bloqueador de transmissão.

Em trabalhos anteriores (Vale *et al.*, 2009_b e Vale *et al.*, 2009_c, *e.g.*), em que foi usado o modelo ANKA, este foi o comportamento observado, não tendo divergido do identificado por nós através do novo modelo ANKA-GFP. Deste modo, constatámos ser possível usar o novo modelo, uma vez que é similar ao anterior no que diz respeito à progressão da infecção no murganho e no mosquito, algo que também foi demonstrado por outros autores (Akaki e Dvorak, 2005; Ramjanee *et al.*, 2007; Delves e Sinden, 2010).

ANKA-GFP tem como vantagem facilitar a identificação dos oocistos, o que leva a uma menor subjectividade aquando a contagem dos mesmos. Está descrito que até os oocistos muito jovens, e como tal de diâmetro mais pequeno, são visíveis na superfície do intestino-médio do mosquito (Franke-Fayard *et al.*, 2004). Talvez por isso, tenham sido observados mais oocistos em ANKA-GFP do que em ANKA (Tabela 4 e Anexo 2).

V.2 Avaliação da Actividade Gametocitocida de Primacenos

A metodologia seguida por nós permite-nos concluir sobre a capacidade de um determinado composto em bloquear a transmissão do parasita ao vector. Contudo, não nos diz se o fármaco actuou especificamente como gametocitocida ou se actuou na fase esporogónica sobre o desenvolvimento do oocisto (Araújo *et al.*, 2005; Vale *et al.*, 2009_c). Em qualquer um dos casos, estamo-nos a referir à acção de bloqueio de transmissão do parasita ao vector, algo que tem uma elevada importância no controlo da malária e no combate ao aumento da resistência aos antimaláricos (Chotivanich *et al.*, 2006).

Os dois critérios utilizados neste estudo foram a percentagem de mosquitos infectados (taxa de infecção) e a média do número de oocistos, o desvio-padrão e o intervalo de confiança a 95% (intensidade de infecção).

A literatura diz-nos que a quantidade de oocistos no mosquito-vector parece estar relacionada com a quantidade de gametócitos presentes no sangue do hospedeiro intermediário no qual o mosquito efectuou a refeição sanguínea infectante (Cantrell e Jordan, 1946; Chotivanich *et al.*, 2006). Os gametócitos são as formas infectantes para o vector e a sua viabilidade é influenciada por vários factores, entre os quais se destaca a acção do sistema imunitário do hospedeiro sobre o parasita e a presença de factores nutritivos para o parasita (Sinden *et al.*, 1996).

Conforme exposto na figura 11 e na tabela 5 (e também no anexo 3), somente os primacenos BIC-902 e BIC-221 apresentaram uma actividade de bloqueio de transmissão significativa, comparativamente ao fármaco parental – a primaquina.

Com o fármaco parental, durante a nossa actividade experimental, foi observada na dose inferior uma taxa de infecção nos mosquitos igual a 41 e na dose superior igual a 35%. O primaceno BIC-902 na dose 50 $\mu\text{mol/kg}$ evidenciou um bloqueio total da transmissão, como uma taxa de infecção e uma intensidade de infecção ambas nulas, não tendo sido observados oocistos nos mosquitos dissecados (num total de 32 mosquitos). O BIC-221 na dose 10 $\mu\text{mol/kg}$, e quando comparado com a primaquina na mesma dose (o mesmo não se verificou na dose superior), também apresentou uma actividade bloqueadora de transmissão superior à da primaquina, com uma taxa de infecção igual a 33%.

Os estudos feitos com *P. falciparum* na Escola de Medicina da Universidade da Califórnia em S. Francisco (EUA), pela equipa do Professor Doutor Philip Rosenthal, revelaram que a concentração de BIC-902 necessária para inibir 50% dos parasitas *in vitro* (IC₅₀) foi de 1,250 micromoles por decímetro cúbico (μM). Uma vez que a IC₅₀ da PQ é igual a 3,300 μM , significa que também neste grupo de trabalho se constatou que o primaceno BIC-902 é um bom candidato a pró-fármaco da PQ (Matos *et al.*, 2011).

Estão também em conformidade com os nossos resultados, os determinados para os primacenos BIC-101, BIC-521 e BIC-226. A IC₅₀ obtida para os dois primeiros na fase eritrocitária (superior a 10,000 μM) é superior à necessária com a primaquina (3,300 μM), o que poderá explicar a elevada taxa e intensidade de infecção. Em relação ao primaceno BIC-226, a IC₅₀ foi ligeiramente acima da do fármaco parental (3,477 μM), ficando igualmente em conformidade com os nossos resultados (Matos *et al.*, 2011). Por outro lado, observa-se uma discrepância entre os nossos resultados e os de Rosenthal e colaboradores para o primaceno BIC-221 que no nosso estudo não apresentou diferenças significativas com o fármaco parental, mas *in vitro* ocorreu o oposto (IC₅₀ superior a 10 μM). Talvez seja necessário repetir este último ensaio, tanto *in vivo*, como *in vitro*.

VI. Conclusão

Com o presente trabalho verificámos que é possível e vantajosa a utilização da estirpe *P. berghei* ANKA-GFP como modelo para estudos de bloqueio de transmissão da malária. A GFP funcionou como uma bandeira, tornando o parasita mais visível e garantindo uma maior objectividade na observação dos factos.

Dos seis primacenos estudados, o primaceno BIC-902 a 50 $\mu\text{mol/kg}$ foi o único que bloqueou por completo a transmissão do parasita ao vector em 100% dos casos estudados. Tendo em conta que o bloqueio da transmissão do parasita ao vector é uma das medidas-chave para o sucesso do controlo e da eliminação da malária, consideramos que estamos perante resultados promissores.

VII. Referências Bibliográficas

Akaki M, Dvorak JA. 2005. *A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites*. J Exp Biol, 208 (16): 3211-8.

Alavi Y, Arai M, Mendoza J, Tufet-Bayona M, Sinha R, Fowler K, Billker O, Franke-Fayard B, Janse CJ, Waters A, Sinden RE. 2003. *The dynamics of interactions between Plasmodium and the mosquito: a study of the infectivity of Plasmodium berghei and Plasmodium gallinaceum, and their transmission by Anopheles stephensi, Anopheles gambiae and Aedes aegypti*. Int J Parasitol, 33 (9): 933-43.

Araújo MJ, Bom J, Capela R, Casimiro C, Chambel P, Gomes P, Iley J, Lopes F, Morais J, Moreira R, de Oliveira E, do Rosário V, Vale N. 2005. *Imidazolidin-4-one derivatives of primaquine as novel transmission-blocking antimalarials*. J Med Chem, 48 (3): 888-92.

Arnold J, Alving AS, Hockwald RS, Clayman CB, Dern RJ, Beutler E, Flanagan CL, Jeffery GM. 1955. *The antimalarial action of primaquine against the blood and tissue stages of falciparum malaria (Panama, P-F-6 strain)*. J Lab Clin Med, 46 (3): 391-7.

Astruc D. 2000. *Chimie Organométallique*. Grenoble Sciences.

Baer K, Klotz C, Kappe SH, Schnieder T, Frevert U. 2007. *Release of hepatic Plasmodium yoelii merozoites into the pulmonary microvasculature*. PLoS Pathog, 3 (11): e171.

Baird JK, Hoffman SL. 2004. *Primaquine therapy for malaria*. Clin Infect Dis, 39: 1336–45.

Baird JK, Rieckmann KH. 2003. *Can primaquine therapy for vivax malaria be improved?* Trends Parasitol, 19: 115–20.

Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S, Mitchell GH. 2000. *A brief illustrated guide to the ultrastructure of Plasmodium falciparum asexual blood stages*. Parasitol Today, 16 (10): 427-33.

Barnwell JW. 2001. *Hepatic Kupffer cells: the portal that permits infection of hepatocytes by malarial sporozoites?* Hepatology, 33 (5): 1331-3.

Basso L, Rodrigues R, Naal R, Costa-Filho A. 2011. *Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes*. Biochimica et Biophysica Acta 2011, 55-64.

Briegel H. 1985. *Mosquito reproduction: incomplete utilization of the blood meal protein for oogenesis*. Journal of Insect Physiology, 31 (1): 15-21.

Brueckner RP, Coster T, Wesche DL, Shmuklarsky M, Schuster BG. 1998. *Prophylaxis of Plasmodium falciparum infection in a human challenge model with WR 238605, a new 8-aminoquinoline antimalarial*. Antimicrob Agents Chemother, 42 (5): 1293-4.

Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. 2005. *WHO estimates of the causes of death in children*. Lancet, 365 (9465): 1147-52.

Buonsenso D, Cataldi L. 2010. *Watch out for malaria: still a leading cause of child death worldwide*. Ital J Pediatr, 36: 58.

Butcher GA, Sinden RE, Billker O. 1996. *Plasmodium berghei: infectivity of mice to Anopheles stephensi mosquitoes*. Exp Parasitol, 84 (3): 371-9.

Cantrell W e Jordan H. 1946. *Changes in the infectiousness of gametocytes during the course of Plasmodium gallinaceum infections*. J Infect Dis, 78: 153-9.

Carter e Diggs. 1977. *Parasitic Protozoa*. Academic Press, New York, 3: 459-65.

Chan TK, Todd D, Tso SC. 1976. *Drug-induced haemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Br Med J, 2 (6046): 1227-9.

Chavain N, Biot C. 2010. *Organometallic complexes: new tools for chemotherapy*. Curr Med Chem, 17 (25): 2729-45.

Chotivanich K, Sattabongkot J, Udomsangpetch R, Looareesuwan S, Day NP, Coleman RE, White NJ. 2006. *Transmission-blocking activities of quinine, primaquine, and artesunate*. Antimicrob Agents Chemother, 50 (6): 1927-30.

Clements A. 1992. *The biology of mosquitoes. Development, nutrition and reproduction – Volume 1*. Chapman and Hall, London, 509pp.

Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW. 1993. *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry, 32 (5): 1212-8.

Coleman MD, Coleman NA. 1996. *Drug-induced methaemoglobinaemia. Treatment issues*. Drug Saf, 14 (6): 394-405.

Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. 2008. *Plasmodium knowlesi malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening*. Clin Infect Dis, 46 (2): 165-71.

Delhaes L, Biot C, Berry L, Delcourt P, Maciejewski LA, Camus D, Brocard JS, Dive D. 2002. *Synthesis of ferroquine enantiomers: first investigation of effects of metallocenic chirality upon antimalarial activity and cytotoxicity*. Chembiochem, 3 (5): 418-23.

Delves MJ, Sinden RE. 2010. *A semi-automated method for counting fluorescent malaria oocysts increases the throughput of transmission blocking studies*. Malar J, 9: 35.

Dive D, Biot C. 2008. *Ferrocene conjugates of chloroquine and other antimalarials: the development of ferroquine, a new antimalarial*. ChemMedChem, 3 (3): 383-91.

Enserink M. 2008. *Signs of drug resistance rattle experts, trigger bold plan*. Science Magazine, 322: 1776.

Fernandes L, Briegel H. 2005. *Reproductive physiology of Anopheles gambiae and Anopheles atroparvus*. J Vector Ecol, 30 (1): 11-26.

Fleck SL, Butcher GA, Sinden RE. 1994. *Plasmodium berghei: serum-mediated inhibition of infectivity of infected mice to Anopheles stephensi mosquitoes*. Exp Parasitol, 78 (1): 20-7.

Fletcher KA, Evans DA, Gilles HM, Greaves J, Bunnag D, Harinasuta T. 1981. *Studies on the pharmacokinetics of primaquine*. Bull World Health Organ, 59 (3): 407-12.

França T, dos Santos M e Figueroa-Villar J. 2008. *Malária: Aspectos Históricos e Quimioterapia*. Quim. Nova, 31 (5): 1271-8.

Franke-Fayard B, Trueman H, Ramesar J, Mendoza J, van der Keur M, van der Linden R, Sinden RE, Waters AP, Janse CJ. 2004. *A Plasmodium berghei reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle*. Mol Biochem Parasitol, 137 (1): 23-33.

Ghosh A, Edwards M e Jacobs-Lorena M. 2000. *The Journey of the Malaria Parasite in the Mosquito: Hopes for the New Century*. Parasitology Today, 16 (5): 196-201.

Gomes P, Vale N, Matos J, Rosenthal P *et al.* 2010. *IC50 dos primacenos em P. falciparum e estruturas moleculares dos primacenos*. Informação não publicada.

Google Imagens. <http://www.google.pt/imghp>. Última consulta a 8 de Março de 2011.

Jain M, Vangapandu S, Sachdeva S, Singh S, Singh PP, Jena GB, Tikoo K, Ramarao P, Kaul CL, Jain R. 2004. *Discovery of a bulky 2-tert-butyl group containing primaquine analogue that exhibits potent blood-schizontocidal antimalarial activities and complete elimination of methemoglobin toxicity*. J Med Chem, 47 (2): 285-7.

Janse CJ, Franke-Fayard B, Waters AP. 2006. *Selection by flow-sorting of genetically transformed, GFP-expressing blood stages of the rodent malaria parasite, Plasmodium berghei*. Nat Protoc, 1 (2): 614-23.

Kaur K, Patel SR, Patil P, Jain M, Khan SI, Jacob MR, Ganesan S, Tekwani BL, Jain R. 2007. *Synthesis, antimalarial, antileishmanial, antimicrobial, cytotoxicity, and methemoglobin (MetHB) formation activities of new 8-quinolinamines*. Bioorg Med Chem, 15 (2): 915-30.

Knell A. 1991. *Malaria. A publication of the tropical programme of the wellcome trust*. Oxford, Oxford University Press, 93pp.

Kochar DK, Tanwar GS, Khatri PC, Kochar SK, Sengar GS, Gupta A, Kochar A, Middha S, Acharya J, Saxena V, Pakalapati D, Garg S, Das A. 2010. *Clinical features of children hospitalized with malaria. A study from Bikaner, northwest India*. Am J Trop Med Hyg, 83 (5): 981-9.

Krettl A e Dantas L. 2000. *Which routes do Plasmodium sporozoites use for successful infections of vertebrates?* Infect Immun, 68: 3064–5.

Krotoski WA, Garnham PC, Cogswell FB, Collins WE, Bray RS, Gwasz RW, Killick-Kendrick R, Wolf RH, Sinden R, Hollingdale M. 1986. *Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. IV. Pre-erythrocytic schizonts and /or hypnozoites of Chesson and North Korean strains of Plasmodium vivax in the chimpanzee*. Am J Trop Med Hyg, 35 (2): 263-74.

Krotoski W, Collins W, Bray R, Garnham P, Cogswell F, Gwadz R, Killick-Kendrick R, Wolf R, Sinden R, Koontz L e Stanfill P. 1982. *Demonstration of Hypnozoites in Sporozoite-Transmitted Plasmodium vivax Infection*. Am J Trop Med Hyg, 31: 1291–3.

Krotoski W, Krotoski D, Garnham P, Bray R, Killick-Kendrick R, Draper C, Targett G e Guy M. 1980. *Relapses in Primate Malaria: Discovery of Two Populations of Exoerythrocytic Stages. Preliminary Note*. British Med J, 1: 153–4.

Lal J, Mehrotra N, Gupta RC. 2003. *Analysis and pharmacokinetics of bulaquine and its major metabolite primaquine in rabbits using an LC-UV method. A pilot study.* J Pharm Biomed Anal, 32 (1): 141-50.

Lobo CA, Kumar N. 1998. *Sexual differentiation and development in the malaria parasite.* Parasitol Today, 14 (4): 146-50.

López-Antuñano FJ. 1999. *Is primaquine useful and safe as true exo-erythrocytic merontocidal, hypnozoitocidal and gametocidal antimalarial drug?* Salud Publica Mex, 41 (5): 410-9.

Matos J, Vale N, Collins M, Gut J, Rosenthal P, Cushion M, Moreira R e Gomes P. 2010. *Primacenes: novel non-cytotoxic primaquine-ferrocene conjugates with anti-Pneumocystis carinii activity.* The Royal Society of Chemistry. Med Chem Commun, 1: 199-201.

Matos J, Prudêncio M, Nogueira F, da Cruz FP, Gut J, Cabrita E, do Rosario VE, Moreira R, Rosenthal PJ e Gomes P. 2011. *Novel potent metallocenes against liver stage malaria.* Manuscrito submetido ao *Journal of Medicinal Chemistry*.

Ménard R. 2005. *Medicine: knockout malaria vaccine?* Nature, 433 (7022): 113-4.

Mihaly GW, Ward SA, Edwards G, Orme ML, Breckenridge AM. 1984. *Pharmacokinetics of primaquine in man: identification of the carboxylic acid derivative as a major plasma metabolite.* Br J Clin Pharmacol, 17 (4): 441-6.

Mota M, Giordano S, Rodriguez A. 2004. *Targeting Plasmodium host cells: survival within hepatocytes.* Trends Mol Med, 10 (10): 487-92.

Nasveld P, Kitchener S. 2005. *Treatment of acute vivax malaria with tafenoquine*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 99 (1): 2-5.

OMS_a. 2010. *World Malaria Report 2010*. Organização Mundial de Saúde, Geneva, 62pp.

OMS_b. 2010:
http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malaria_ITHRiskMap.JPG.
Última consulta a 8 de Março de 2011.

OMS_c. 2010. *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010*. Organização Mundial de Saúde, Geneva, 115pp.

Pérez HA. 2004. *La malaria por Plasmodium vivax (Grassi y Feletti, 1980) en los trópicos y los retos de la cura radical*. INCI, 29 (9): 490-5.

Peters W. 1973. *Antimalarial drugs and their actions*. Postgrad Med J, 49 (574): 573-83.

Phillips RE, Warrell DA. 1986. *The pathophysiology of severe falciparum malaria*. Parasitol Today, 2 (10): 271-82.

Portela MJ, Moreira R, Valente E, Constantino L, Iley J, Pinto J, Rosa R, Cravo P, do Rosário VE. 1999. *Dipeptide derivatives of primaquine as transmission-blocking antimalarials: effect of aliphatic side-chain acylation on the gametocytocidal activity and on the formation of carboxyprimaquine in rat liver homogenates*. Pharm Res, 16 (6): 949-55.

Pukrittayakamee S, Chotivanich K, Chantha A, Clemens R, Looareesuwan S, White NJ. 2004. *Activities of artesunate and primaquine against asexual- and sexual-stage parasites in falciparum malaria*. Antimicrob Agents Chemother, 48 (4): 1329-34.

Puri SK, Dutta GP. 2005. *Plasmodium cynomolgi: gametocytocidal activity of the anti-malarial compound CDRI 80/53 (elubaquine) in rhesus monkeys*. Exp Parasitol, 111 (1): 8-13.

Ramjanee S, Robertson JS, Franke-Fayard B, Sinha R, Waters AP, Janse CJ, Wu Y, Blagborough AM, Saul A, Sinden RE. 2007. *The use of transgenic Plasmodium berghei expressing the Plasmodium vivax antigen P25 to determine the transmission-blocking activity of sera from malaria vaccine trials*. Vaccine, 25 (5): 886-94.

Ridley RG, Hudson AT. 1998. *Chemotherapy of malaria*. Curr Opin Infect Dis, 11 (6): 691-705.

Rosenberg R, Wirtz RA, Schneider I, Burge R. 1990. *An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 84 (2): 209-12.

Russell P. 1943. *Malaria and its influence on world health: The Hermann M. Biggs Memorial Lecture*. Bull N Y Acad Med, 19 (9): 599-630.

Serebrennikova YM, Patel J, Milhous WK, García-Rubio LH. 2010. *Quantitative analysis of morphological alterations in Plasmodium falciparum infected red blood cells through theoretical interpretation of spectral measurements*. J Theor Biol, 265 (4): 493-500.

Shimomura O, Johnson F, Saiga Y. 1962. *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 59: 223-39.

Shortt He, Garnham Pc, Malamos B. 1948. *The pre-erythrocytic stage of mammalian malaria*. Br Med J, 1 (4543): 192-4.

Sinden RE, Butcher GA, Billker O, Fleck SL. 1996. *Regulation of infectivity of Plasmodium to the mosquito vector*. Adv Parasitol, 38: 53-117.

Sinden RE, Hartley RH, Winger L. 1985. *The development of Plasmodium ookinetes in vitro: an ultrastructural study including a description of meiotic division*. Parasitology, 91 (2): 227-44.

Sinden RE. 2002. *Molecular interactions between Plasmodium and its insect vectors*. Cell Microbiol, 4 (11): 713-24.

Srivastava P, Sahni SK, Tripathi LM, Puri SK, Dutta GP, Pandey VC. 1992. *Kinetic and substrate binding characterization of hepatic mixed function oxidase system in monkeys with primaquine and (N1-3-acetyl-4-5-dihydro-2-furanyl)-N4-(methoxy-8-quinolinyl) 1,4-peptane-diamine*. Biochem Pharmacol, 43 (4): 904-7.

Strother A, Allahyari R, Buchholz J, Fraser IM, Tilton BE. 1984. *In vitro metabolism of the antimalarial agent primaquine by mouse liver enzymes and identification of a methemoglobin-forming metabolite*. Drug Metab Dispos, 12 (1): 35-44.

Sutherland CJ, Tanomsing N, Nolder D, Oguike M, Jennison C, Pukrittayakamee S, Dolecek C, Hien TT, do Rosário VE, Arez AP, Pinto J, Michon P, Escalante AA, Nosten F, Burke M, Lee R, Blaze M, Otto TD, Barnwell JW, Pain A, Williams J, White NJ, Day NP, Snounou G, Lockhart PJ, Chiodini PL, Imwong M, Polley SD. 2010. *Two non-recombining sympatric form of the human malaria parasite Plasmodium ovale occur globally*. J Infect Dis, 201 (10): 1544-50.

Teixeira F. 2006. *Terapêutica Medicamentosa e Suas Bases Farmacológicas*. Cap. 64 (5.^a ed). Porto, Porto Editora, 1022pp.

Thiam MH, Diop BM, Dieng Y, Guèye M. 2002. *Mental disorders in cerebral malaria*. Dakar Med, 47 (2): 122-7.

Tsien RY. 1998. *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 67: 509-44.

Vale N, Moreira R, Gomes P. 2009. *Primaquine revisited six decades after its discovery*. Eur J Med Chem, 44 (3): 937-53.

Vale N, Nogueira F, do Rosário VE, Gomes P, Moreira R. 2009b. *Primaquine dipeptide derivatives bearing an imidazolidin-4-one moiety at the N-terminus as potential antimalarial prodrugs*. Eur J Med Chem, 44 (6): 2506-16.

Vale N, Prudêncio M, Marques CA, Collins MS, Gut J, Nogueira F, Matos J, Rosenthal PJ, Cushion MT, do Rosário VE, Mota MM, Moreira R, Gomes P. 2009c. *Imidazoquinones as antimalarial and antipneumocystis agents*. J Med Chem, 52 (23):7800-7.

van Spaendonk RM, Ramesar J, van Wigcheren A, Eling W, Beetsma AL, van Gemert GJ, Hooghof J, Janse CJ, Waters AP. 2001. *Functional equivalence of structurally distinct ribosomes in the malaria parasite, Plasmodium berghei*. J Biol Chem, 276 (25): 22638-47.

van Staveren DR, Metzler-Nolte N. 2004. *Bioorganometallic chemistry of ferrocene*. Chem Rev, 104 (12): 5931-85.

Vennerstrom JL, Nuzum EO, Miller RE, Dorn A, Gerena L, Dande PA, Ellis WY, Ridley RG, Milhous WK. 1999. *8-Aminoquinolines active against blood stage Plasmodium falciparum in vitro inhibit hematin polymerization*. Antimicrob Agents Chemother, 43 (3): 598-602.

Wells T, Burrows J e Baird J. 2010. *Targeting the Hypnozoite Reservoir of Plasmodium vivax: The Hidden Obstacle to Malaria Elimination*. Trends in Parasitology, 26: 145–151.

White N e Breman J. 2006. *Harrison Medicina Interna*. Volume I (16.^a ed.). McGrawHill, Rio de Janeiro, 1565pp.

White N. 2008. *The role of anti-malarial drugs in eliminating malaria*. Malaria Journal, 7 (1):S8.

White N. 2009. *Manson's Tropical Diseases*. Cap. 73 (22.^a ed.). Saunders Elsevier, London, 1830pp.

VIII. ANEXOS

VIII.1 Tratamento de Dados Referentes à Implementação de um Novo Modelo Murino – Parasitemia

Tabela 7 – Parasitemias determinadas durante os quatro dias pós-infecção e resultados da exflagelação.

hpi	anka	anka-gfp	exflagelação
24	0	0	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
	0	0	
48	1	0,69	
	0,5	0,5	
	0,5	0,5	
	1	0,94	
	0	0,44	
	1,5	0,5	
	0,9	0,5	
	1,3	0,75	
	0,9	0,5	
72	23,5	15,75	
	18	15,75	
	14	13,5	
	14,5	8,25	
	17	14,5	
	16	11,75	
	18,5	17,75	
	27	12,75	
	22	8,5	
96	43,9	36	Positivo/ Positivo
	32,5	34,5	Positivo/ Positivo
	33,3	22,03	Positivo/ Positivo
	17,5	16	Positivo/ Positivo
	19,1	22,05	Positivo/ Positivo
	35,2	20,5	Positivo/ Positivo
	40	29,25	Positivo/ Positivo
	32,3	15,75	Positivo/ Positivo
	17,6	11	Positivo/ Positivo

Tabela 8 – Estatística descritiva dos resultados da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.

variáveis dependentes	hpi			estatística	erro padrão
parasitemia anka	48	média		,8444	,15103
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	,4962	
			limite superior	1,1927	
		mediana		,9000	
		variância		,205	
		desvio-padrão		,45308	
		mínimo		,00	
		máximo		1,50	
	72	média		18,9444	1,45641
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	15,5859	
			limite superior	22,3029	
		mediana		18,0000	
		variância		19,090	
		desvio-padrão		4,36924	
		mínimo		14,00	
		máximo		27,00	
	96	média		30,1556	3,27296
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	22,6081	
			limite superior	37,7030	
		mediana		32,5000	
		variância		96,410	
		desvio-padrão		9,81887	
		mínimo		17,50	
		máximo		43,90	
parasitemia anka gfp	48	média		,5911	,05541
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	,4633	
			limite superior	,7189	
		mediana		,5000	
		variância		,028	
		desvio-padrão		,16624	
		mínimo		,44	
		máximo		,94	
	72	média		13,1667	1,08253
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	10,6703	

			limite superior	15,6630	
		mediana		13,5000	
		variância		10,547	
		desvio-padrão		3,24760	
		mínimo		8,25	
		máximo		17,75	
	96	média		23,0089	2,87220
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	16,3856	
			limite superior	29,6322	
		mediana		22,0300	
		variância		74,246	
		desvio-padrão		8,61661	
		mínimo		11,00	
		máximo		36,00	

Os resultados referentes às 24hpi foram constantes (iguais a zero), tendo sido omitidos.

Tabela 9 – Teste da normalidade para a parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.

	grupo	Kolmogorov-Smirnov		
		estatística	graus de liberdade	valor-p
48hpi	anka	,215	9	,200
	ankagfp	,375	9	,001 ^{a)}
72hpi	anka	,207	9	,200
	ankagfp	,147	9	,200
96hpi	anka	,253	9	,100
	ankagfp	,211	9	,200

Os resultados referentes às 24hpi foram constantes (iguais a zero), tendo sido omitidos.

^{a)} Como o valor-p é inferior a 0,05, às 48hpi em ANKA-GFP as variáveis não seguem uma distribuição normal.

Tabela 10 - Teste da homogeneidade das variâncias da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.

		Levene ^{a)}			
		estatística	graus de liberdade 1	graus de liberdade 2	valor-p
48hpi	Baseado na Média	4,663	1	16	,046
	Baseado na Mediana	3,659	1	16	,074
72hpi	Baseado na Média	,916	1	16	,353
	Baseado na Mediana	,467	1	16	,504
96hpi	Baseado na Média	,303	1	16	,590
	Baseado na Mediana	,086	1	16	,773

Os resultados referentes às 24hpi foram constantes (iguais a zero), tendo sido omitidos.

^{a)} Como o valor-p é superior a 0,05, as variâncias são homogêneas.

Tabela 11 – Sumário do teste de hipóteses para amostras independentes Kruskal-Wallis na análise da parasitemia em ANKA e em ANKA-GFP.

hipótese nula	valor-p	decisão*
às 24hpi, a mediana da parasitemia em ANKA é igual à de ANKA-GFP	1	Não rejeitar a hipótese nula
às 48hpi, a mediana da parasitemia em ANKA é igual à de ANKA-GFP	0,092	Não rejeitar a hipótese nula.
às 72hpi, a mediana da parasitemia em ANKA é igual à de ANKA-GFP	0,006	Rejeitar a hipótese nula
às 96hpi, a mediana da parasitemia em ANKA é igual à de ANKA-GFP	0,171	Não rejeitar a hipótese nula.

**A um nível de significância de 0,05.*

VIII.2 Tratamento de Dados Referentes à Implementação de um Novo Modelo Murino – Oocistos

Tabela 12 – Número de oocistos por intestino-médio de mosquito em ANKA e em ANKA-GFP.

ANKA STRAT	120	ANKA PQ10	18	ANKA PQ50	1	ANKA-GFP STRAT	59	ANKA-GFP PQ10	120	ANKA-GFP PQ50	120
	16		12		0		1		39		120
	12		10		0		0		11		120
	28		27		1		0		1		10
	120		40		3		1		2		120
	58		50		0		120		0		105
	120		3		0		120		46		0
	120		1		0		0		2		0
	120		1		0		82		32		0
	120		30		0		1		11		0
	78		4		0		1		60		0
	119		13		2		5		6		0
	120		2		1		37		60		0
	120		0		0		104		0		0
	14		0		0		6		0		0
	42		9		0		28		0		0
	1		0		0		13		0		0
	5		3		2		1		0		0
	4		7		3		4		0		0
	19		4		0		96		0		0
	1		0		0		63		0		0
	2		0		0		120		0		120
	3		0		2		120		0		120
	15		0		0		94		0		2
	16		1		2		120		0		36
	20		0		0		78		0		3
	4		5		0		120		0		103
	8		0		0		120		0		28
	26		2		4		120		0		5
	0		2		2		8		0		1
	2		0		0		0		0		1
	47		0		0		120		1		5
	10		0		0		0		1		3
	17		0		0		120		2		85
	12		0		0		120		0		19
	20		0		0		120		1		0
	11		2		0		120		3		0
	11		0		0		53		24		0
	5		0		0		120		7		0
	16		2		3		120		11		0
	17		0		2		89		0		0
	2		0		0		120		0		0
	1		2		0		120		17		0

0	0	0	120	0	0
0	0	1	36	2	0
2	1	0	120	4	0
0	0	0	120	0	0
13	0	0	33	53	0
7	0	0	120	0	0
11	2	0	120	3	0
2	0	1	120	0	0
3	1	0	1	0	0
0	0	1	120	0	0
0	0	0	120	0	0
0	0	1	120	0	0
3	2	4	120	0	0
2	0	0	120	0	0
2	0	1	120	0	
1	0	6	120	0	
8	0	0	120	0	
12	0	0	120	0	
10	2	0	120	0	
19	25	0	0	0	
0	3	0		0	
17	0	0		0	
0	6	0		0	
0	0	0		0	
0	0	0		0	
0	0	0		0	
17	0	0		0	
15	2	0		26	
33	1	0		120	
0	0	0		4	
32	0	0		1	
0	0	0		120	
1	2	3		120	
66	0	0		2	
67	1	0		0	
18	0	0		47	
2	2	0			
28	0	0			
37	0	0			
0	4	0			
0	0	0			
34	0	0			
7	1	0			
24	0	0			
3	0	0			
24	3	0			
3	0	0			
12	0	0			
0	38	0			
1	0	0			
1	2				

	2		3							
	13		0							
	2		5							
	3		0							
	3		0							
	0		0							
	4		37							
	0		0							
	0		23							
	3		0							
	0									
	0									
	4									

Tabela 13 – Estatística descritiva dos resultados dos oocistos em ANKA e em ANKA-GFP.

variáveis dependentes	grupo			estatística	erro padrão
sem tratamento	anka	média		20,4953	3,26714
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	14,0179	
			limite superior	26,9727	
		mediana		7,0000	
		variância		1142,139	
		desvio-padrão		33,79555	
		mínimo		,00	
		máximo		120,00	
	ankagfp	média		77,0476	6,51755
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	64,0192	
			limite superior	90,0760	
		mediana		120,0000	
		variância		2676,143	
		desvio-padrão		51,73145	
		mínimo		,00	
		máximo		120,00	
tratamento com PQ10	anka	média		4,0000	,92361
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	2,1682	
			limite superior	5,8318	
		mediana		,0000	
		variância		88,718	
		desvio-padrão		9,41905	
		mínimo		,00	
		máximo		50,00	
	ankagfp	média		12,1392	3,24539
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	5,6782	
			limite superior	18,6003	
		mediana		,0000	
		variância		832,070	
		desvio-padrão		28,84563	

tratamento com PQ50	anka	mínimo		,00	
		máximo		120,00	
		média		,3462	,15012
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	,0448	
			limite superior	,6475	
		mediana		,0000	
		variância		1,172	
		desvio-padrão		1,08256	
		mínimo		,00	
		máximo		6,00	
	ankagfp	média		19,7544	5,47352
		intervalo de confiança para a média 95%	limite inferior	8,7896	
			limite superior	30,7192	
		mediana		,0000	
		variância		1707,689	
		desvio-padrão		41,32419	
		mínimo		,00	
		máximo		120,00	

Tabela 14 - Teste da normalidade para os oocistos de ANKA e ANKA-GFP, subgrupo sem tratamento.

	grupo	Kolmogorov-Smirnov ^{a)}		
		estatística	graus de liberdade	valor-p
sem tratamento	anka	,282	107	,000
	ankagfp	,321	63	,000

^{a)} Como o valor-p é inferior a 0,05, no subgrupo sem tratamento em ANKA e em ANKA-GFP as variáveis não seguem uma distribuição normal.

Tabela 15 - Teste da homogeneidade das variâncias dos oocistos de ANKA e de ANKA-GFP, subgrupo sem tratamento.

		Levene ^{a)}			
		estatística	graus de liberdade 1	graus de liberdade 2	valor-p
sem tratamento	Baseado na Média	46,154	1	168	,000
	Baseado na Mediana	14,278	1	168	,000

^{a)} Como o valor-p é inferior a 0,05, no subgrupo sem tratamento em ANKA e em ANKA-GFP as variâncias não são homogêneas.

Tabela 16 – Sumário do teste de hipóteses para amostras independentes Kruskal-Wallis na análise dos oocistos dos grupos ANKA e ANKA-GFP.

hipótese nula	valor-p	decisão*
Sem tratamento, a mediana do número de oocistos em ANKA é igual à de ANKA-GFP.	0	Rejeitar a hipótese nula
Com PQ10, a mediana do número de oocistos em ANKA é igual à de ANKA-GFP.	0,714	Não rejeitar a hipótese nula.
Com PQ50, a mediana do número de oocistos em ANKA é igual à de ANKA-GFP.	0,006	Rejeitar a hipótese nula

*A um nível de significância de 0,05.

VIII.3 Tratamento de Dados Referentes à Avaliação da Actividade Gametocitocida de Primacenos – Oocistos

Tabela 17 - Número de oocistos por intestino-médio de mosquito no ensaio dos primacenos.

BIC-101-10	0	BIC-101-50	0	BIC-221-10	1	BIC-221-50	61	BICO-521-10	0	BBIC-521-50	0
	1		0		46		120		0		0
	1		0		49		86		0		0
	1		0		1		0		0		0
	2		0		1		0		0		0
	2		1		0		0		0		0
	2		1		0		0		0		0
	2		1		0		0		0		0
	4		1		0		0		0		0
	4		1		0		0		0		0
	5		2		0		0		0		0
	5		3		0		0		0		0
	5		3		0		0		0		1
	6		4		0		0		0		2
	6		5		0		0		0		2
	7		6		0		0		0		3
	9		13		0		0		0		4
	12		20		0		0		0		4
	12		20		0		0		0		5
	12		24		0		0		0		5
	14		31		0		0		0		5
	14		40		0		0		0		6
	14		50		0		0		1		7
	15		53		0		0		1		7
	16		60		0		1		1		7
	16		60		0		12		1		9
	17		70		0		6		1		9
	18		70		0		5		2		11
	20		90		0		1		2		13
	21		90		0		0		2		14
	21		103		0		0		2		15
	22		120		0		0		2		16
	24		120		0		0		3		18
	31		120		0		0		3		19
	33		120		0		0		3		19
	37		120		0		0		4		19
	39		120		136		0		4		20
	44		120		109		0		4		22
	45		120		0		0		5		23
	60		120		0		0		6		23
	65		120		0		0		6		24
	80		120		0		0		7		24

85			0	0	7	25
96			0	0	8	26
100			0	0	8	26
103			0	120	9	26
109			0	120	9	27
120			0	43	9	28
120			0	81	10	28
120			46	0	10	29
120			2	0	10	30
120			14	0	10	33
120			0	0	13	37
120			9	0	13	38
120			100	0	13	39
120			100	0	14	39
120			61	0	15	39
120			44	0	15	43
120			4	0	15	43
			10	0	15	43
			9	0	15	45
			110	0	17	56
			4	0	18	60
			4	0	21	64
			7	0	23	65
				6	24	66
				62	25	70
				3	28	71
				110	36	71
				3	36	73
				89	37	74
				70	37	85
				73	47	90
				85	56	90
				19	58	94
				73	59	95
				119	60	95
				120	60	96
				120	65	101
				120	73	108
				120	74	110
				120	75	110
				120	83	115
				120	90	120
				120	101	120
				120	102	120
				120	110	120
				120	120	120
				120	120	120
				120	120	120
				120		
				120		

BIC-226-10	120	BIC-226-50	0	BIC-227-10	120	BIC-227-50	0	BIC-902-10	0	BIC-902-50	0
	120		0		120		109		0		0
	120		0		120		120		0		0
	120		0		30		9		0		0
	17		0		120		97		0		0
	54		0		120		36		0		0
	110		0		3		120		0		0
	101		0		0		9		0		0
	110		0		120		108		120		0
	114		0		51		0		120		0
	0		0		12		120		120		0
	0		0		0		120		120		0
	120		0		25		35		120		0
	120		0		2		103		0		0
	120		0		0		40		120		0
	120		0		0		6		95		0
	120		0		108		81		120		0
	51		0		120		9		0		0
	94		0		120		120		9		0
	5		1		3		5		4		0
	113		1		61		120		0		0
	120		5		120		120		120		0
	120		65		2		120		13		0
	120		70		0		97		0		0
	120		85		0		113		0		0
	120		85		2		120		94		0
	120		97		0		47		120		0
	120		100		0		120		120		0
	120		106		0		120		12		0
	6		110		120		80		0		0
			112		0		120		0		0
			115		2		83		7		0
			120		2		73		0		
					2		17		120		
					0		33		81		
					0		120		12		
					120		120		120		
					120		81		1		
					120		12		34		
					5		9		9		
					13		120		0		
					25		42		0		
					0		120		4		
					0		8		120		
							32		23		
							5		0		
							2		55		
							8		4		
							10		0		

						0		22	
						0		120	
						0		5	
						0		15	
						0		11	
						0		97	
						0		113	
						1		10	
						3		120	
						3		0	
						1		0	
						13		18	
						5		120	
						1		0	
						85		120	
						1		7	
						106		120	
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						6			
						4			
						12			
						97			
						1			
						112			
						120			
						1			
						1			
						115			
						3			
						8			
						7			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						0			
						120			

Tabela 18 – Estatística descritiva dos resultados dos oocistos no ensaio dos primacenos.

ensaio			estatística	erro padrão
oocistos	BIC-101 10	média	45,71	6,083
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	33,54
			limite superior	57,89
		mediana	21	
		variância	2182,967	
		desvio-padrão	46,722	
		mínimo	0	
		máximo	120	
	BIC-101 50	média	51	7,715
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	35,42
			limite superior	66,58
		mediana	35,5	
		variância	2499,659	
		desvio-padrão	49,997	
		mínimo	0	
		máximo	120	
	BIC-206 10	média	93,83	7,989
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	77,49
			limite superior	110,17
		mediana	120	
		variância	1914,764	
		desvio-padrão	43,758	
		mínimo	0	
		máximo	120	
	BIC-206 50	média	32,48	8,24
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	15,7
			limite superior	49,27
		mediana	0	
		variância	2240,383	
		desvio-padrão	47,333	
		mínimo	0	
		máximo	120	
	BIC-221 10	média	13,09	3,801
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	5,5
			limite superior	20,69
		mediana	0	
		variância	938,929	
		desvio-padrão	30,642	
		mínimo	0	
		máximo	120	
	BIC-221 50	média	33,49	5,226
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	23,11
			limite superior	43,88
		mediana	0	

		variância		2485,186	
		desvio-padrão			
		mínimo		0	
		máximo		120	
	BIC-227 10	média		43,5	8,158
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	27,05	
			limite superior	59,95	
		mediana		4	
		variância		2928,302	
		desvio-padrão			
		mínimo		0	
		máximo		124	
	BIC-227 50	média		42,73	5,129
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	32,55	
			limite superior	52,91	
		mediana		9	
		variância		2552,24	
		desvio-padrão			
		mínimo		0	
		máximo		120	
	BIC-521 10	média		22,81	3,46
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	15,94	
			limite superior	29,69	
		mediana		8,5	
		variância		1077,526	
		desvio-padrão			
		mínimo		0	
		máximo		120	
	BIC-521 50	média		41,1	4,202
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	32,75	
			limite superior	49,45	
		mediana		26	
		variância		1589,372	
		desvio-padrão			
		mínimo		0	
		máximo		120	
	BIC-902 10	média		44,17	6,546
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	31,09	
			limite superior	57,24	
		mediana		10,5	
		variância		2827,833	
		desvio-padrão			
		mínimo		0	
		máximo		120	
	BIC-902 50	média		0,03	0,031
		intervalo de confiança para a média a 95%	limite inferior	-0,03	

		superior		
	mediana		0	
	variância		0,031	
	desvio-padrão			
	mínimo		0	
	máximo		1	

Tabela 19 – Teste da normalidade para os oocistos no ensaio dos primacenos.

Kolmogorov-Smirnov ^{a)}				
	Ensaio	estatística	graus de liberdade	valor-p
Oocistos	BIC-101 10	0,238	59	0
	BIC-101 50	0,197	42	0
	BIC-206 10	0,344	30	0
	BIC-206 50	0,386	33	0
	BIC-221 10	0,386	65	0
	BIC-221 50	0,369	91	0
	BIC-227 10	0,284	44	0
	BIC-227 50	0,289	97	0
	BIC-521 10	0,272	90	0
	BIC-521 50	0,176	90	0
	BIC-902 10	0,284	66	0
	BIC-902 50	0,539	32	0

^{a)} Como o valor-p é inferior a 0,05, as variáveis não seguem uma distribuição normal.

Tabela 20 - Teste da homogeneidade das variâncias dos oocistos no ensaio dos primacenos.

		Levene ^{a)}			
		estatística	graus de liberdade 1	graus de liberdade 2	valor-p
oocistos	Baseado na Média	23,864	14	923	0
	Baseado na Mediana	6,331	14	923	0

^{a)} Como o valor-p é inferior a 0,05, as variâncias não são homogêneas.

Tabela 21 – Sumário do teste de hipóteses para amostras independentes Kruskal-Wallis na análise dos oocistos no ensaio dos primacenos.

primaceno	hipótese nula	valor-p	decisão*
BIC-101	mediana PC10 = STRAT	,009	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = STRAT	,018	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula
BIC-221	mediana PC10 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ10	,482	Não rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ10	,220	Não rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ50	,721	Não rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ50	,227	Não rejeitar a hipótese nula
BIC-521	mediana PC10 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula

	mediana PC50 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula
BIC-226	mediana PC10 = STRAT	,299	Não rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ10	,403	Não rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ50	,448	Não rejeitar a hipótese nula
BIC-227	mediana PC10 = STRAT	,004	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ50	,001	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula
BIC-902	mediana PC10 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = STRAT	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ10	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC10 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula
	mediana PC50 = PQ50	,000	Rejeitar a hipótese nula

**A um nível de significância de 0,05.*